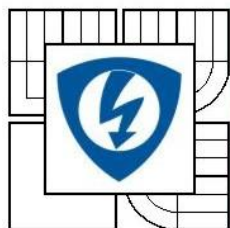




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ  
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH  
TECHNOLOGIÍ  
ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION  
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

## ANALÝZA BIOLOGICKY VÝZNAMNÝCH LÁTEK

ANALYSIS OF BIOLOGICAL SIGNIFICANT SUBSTANCES

DIPLOMOVÁ PRÁCE  
DIPLOMA THESIS

AUTOR PRÁCE  
AUTHOR

Bc. DENISA MADĚRÁNKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE  
SUPERVISOR

Ing. JIŘÍ ROLEČEK

ODBORNÝ VEDOUCÍ  
TECHNICAL SUPERVISOR

Ing. KAREL KLEPÁRNÍK, CSc.

BRNO 2008

# **ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE**

# LICENČNÍ SMLOUVA



## ABSTRAKT

V této diplomové práci jsou popsány vybrané metody Ramanovy spektroskopie jako je povrchově zesílená Ramanova spektroskopie a jednomolekulová Ramanova spektroskopie. Také jsou zde uvedeny základy numerických metod „Discrete Dipole Approximation“ a „Finite Difference Time Domain“ pro modelování optických vlastností mikro- a nanočástic, které se používají pro povrchově zesílenou Ramanovu spektroskopii a další nanospektrometrické metody. Je zde dále popsána základní instrumentace používaná pro měření Ramanových spekter. Experimentální část práce je zaměřena na numerické modelování jevu „photonic nanojet“ vznikající na zastíněné straně dielektrických mikročástic. Tento jev by bylo možné využít pro novou metodu konfokální mikroskopie se současným snímáním Ramanových spekter. Pro modelování byla použita metoda „Finite Difference Time Domain“. Druhá experimentální část práce obsahuje výsledky měření klasických Ramanových spekter  $\beta$ -karotenu a povrchově zesílených Ramanových spekter  $\beta$ -karotenu v suspenzi nanočástic.

## ABSTRACT

Selected methods of Raman spectroscopy, like surface-enhanced Raman spectroscopy and single molecule Raman spectroscopy, are described in this diploma work. The basis of two methods for numerical modelling of optical properties of micro- and nanoparticles are prefaced. The methods are Discrete Dipole Approximation and Finite Difference Time Domain. Micro- and nanoparticles are used in surface enhanced Raman spectroscopy and other nanospectroscopic methods. Further, the main instrumentation needed for Raman spectroscopy is described. The first part of experimental section of this work is numerical modelling of photonic nanojet that occurs behind dielectric microparticles. This phenomenon leads to a new technique of confocal microscopy with Raman spectra measuring. The second experimental section contains results of Raman spectra measurement with  $\beta$ -carotene and surface-enhanced Raman spectra of  $\beta$ -carotene in silver-sol solution.

## KLÍČOVÁ SLOVA

Ramanův jev, Ramanova spektroskopie, SERS, nanočástice, FDTD metoda, „photonic nanojet“,  $\beta$ -karoten.

## KEY WORDS

Raman scattering, Raman spectroscopy, SERS, nanoparticles, FDTD method, photonic nanojet,  $\beta$ -carotene.

## Bibliografická citace

MADĚRÁNKOVÁ, D. *Analýza biologicky významných látek*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2008. 89 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Jiří Roleček.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci na téma „Analýza biologicky významných látek“ vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této diplomové práce jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědoma následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení § 152 trestního zákona č. 140/1961 Sb.

V Brně dne .....

.....

podpis autora

## PODĚKOVÁNÍ

Děkuji Ústavu analytické chemie AV ČR, v.v.i., kde byla má diplomová práce řešena, a to především Ing. Karlu Klepárníkovi za jeho cenné rady a konzultace. Dále bych poděkovala Dr. Alexandrovi Jonášovi z Ústavu přístrojové techniky AV ČR, v.v.i., za velkou ochotu provést na svém pracovišti některá měření. Také děkuji vedoucímu práce Ing. Jiřímu Rolečkovi za ochotu spolupracovat s AV ČR.

V Brně dne .....

.....

podpis autora

# OBSAH

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE .....	1
LICENČNÍ SMLOUVA.....	3
ABSTRAKT .....	5
ABSTRACT .....	5
KLÍČOVÁ SLOVA.....	6
KEY WORDS .....	6
Bibliografická citace.....	6
PROHLÁŠENÍ .....	7
PODĚKOVÁNÍ.....	7
OBSAH.....	8
1 ÚVOD.....	9
2 TEORETICKÝ ROZBOR.....	10
2.1 RAMANŮV JEV VE SPEKTROSKOPII.....	10
2.1.1 Princip Ramanova jevu.....	10
2.1.2 Speciální metody Ramanovy spektroskopie.....	15
2.1.2.1 Rezonanční Ramanova spektroskopie .....	15
2.1.2.2 Povrchově zesílená Ramanova spektroskopie.....	16
2.1.2.3 Ramanova spektroskopie buněk .....	21
2.1.2.4 Jednomolekulová Ramanova spektroskopie.....	22
2.1.2.4 Další speciální metody Ramanovy spektroskopie .....	23
2.1.3 Nanočástice pro SERS.....	25
2.1.3.1 Kovové nanočástice.....	25
2.1.3.2 Modelování optických vlastností částic.....	27
2.2 INSTRUMENTACE PRO RAMANOVU SPEKTROSKOPII .....	36
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	43
3.1 MODELOVÁNÍ ELEKTROMAGNETICKÉHO POLE.....	43
3.1.1 2D FDTD modelování .....	43
3.1.2 Modelování dielektrických mikročástic .....	50
3.2 MĚŘENÍ RAMANOVÝCH SPEKTER .....	55
3.2.1 Měřicí pracoviště .....	55
3.2.2 Ramanova spektra.....	57
4 ZÁVĚR.....	66
5 LITERATURA .....	68
Seznam použitých zkratk .....	75
Seznam použitých symbolů.....	76
Seznam příloh.....	79
PŘÍLOHA 1: FDTD2D zdrojový kód .....	80
PŘÍLOHA 2: Modelování dielektrických mikročástic.....	83



# 1 ÚVOD

Tato diplomová práce na téma „Analýza biologicky významných látek“ byla zaměřena na Ramanovu spektroskopii, což je analytická metoda známá již z třicátých let minulého století, ale velkého rozmachu se dočkala až s vývojem moderních technologií jako jsou laserové zdroje, CCD detektory a nanotechnologie. K moderním metodám Ramanovy spektroskopie patří i využití nanočástic. Součástí práce je tedy i modelování optického jevu za dielektrickými mikročásticemi, který by bylo možné využít pro Ramanovu spektroskopii a konfokální mikroskopii.

Metodami Ramanovy spektroskopie jsou identifikovány anorganické i organické látky pomocí spektra vibračních stavů vazeb v molekulách, které jsou pro každou látku charakteristické. Ramanova spektroskopie byla ve svých počátcích schopna měřit pouze látky ve vysokých koncentracích, dnešní přístrojové vybavení a znalost podmínek Ramanova jevu dokáže detekovat i jednotlivé molekuly.

V teoretickém úvodu práce jsou shrnuty nejpoužívanější metody Ramanovy spektroskopie a je zde také uvedena základní instrumentace potřebná k měření Ramanových spekter. Dále jsou popsány možnosti analýzy biologicky významných látek v jedné buňce a možnosti kvalitativní analýzy jedné molekuly. Také jsou popsány dvě numerické metody používané pro modelování optických vlastností částic. Jsou to metody „Discrete Dipole Approximation“ a „Finite Difference Time Domain“.

Experimentální část práce je rozdělena na dva bloky. První je věnován praktickému řešení numerického modelování šíření elektromagnetického pole kolem dielektrické mikročástice. Na zastíněné straně mikročástice vzniká jev „photonic nanojet“, což je lokální zesílení elektromagnetického pole. K modelování byla vybrána metoda „Finite Difference Time Domain“, která se velmi často používá právě pro řešení šíření elektromagnetického pole v okolí nanočástic různých tvarů a materiálů. Jako programovací prostředek k napsání algoritmu byl použit Matlab.

Druhá kapitola experimentální části obsahuje popis uspořádání měřicí soustavy a výsledky měření Ramanových spekter. Měřena byla jak klasická Ramanova spektra, tak SERS v suspenzi stříbrných koloidních částic. Jako biologicky významná látka pro měření Ramanových spekter byl vybrán  $\beta$ -karoten

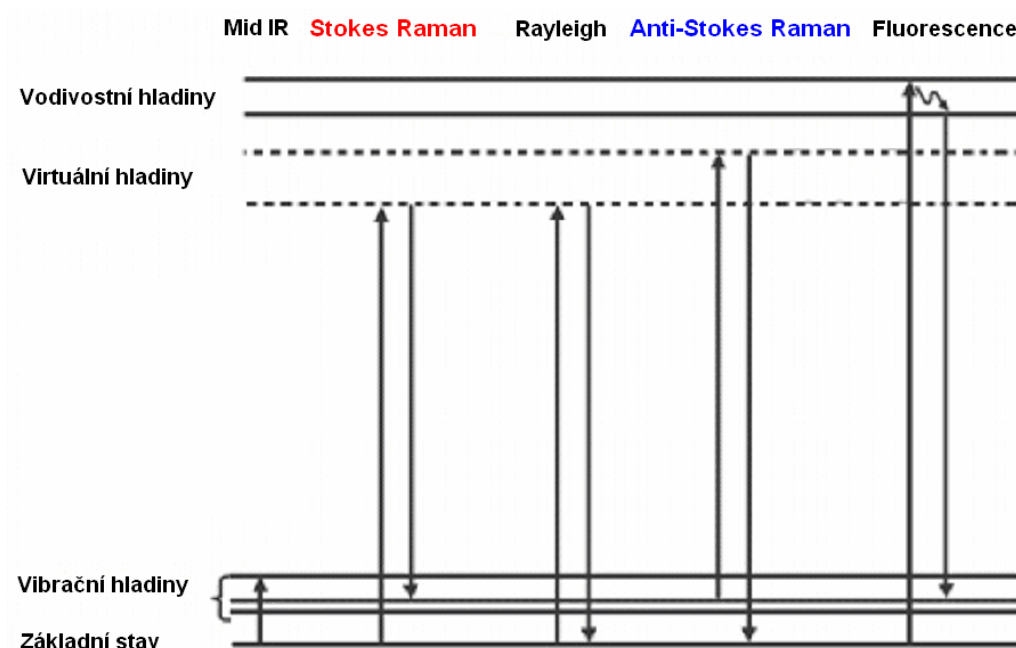
## 2 TEORETICKÝ ROZBOR

### 2.1 RAMANŮV JEV VE SPEKTROSKOPII

#### 2.1.1 Princip Ramanova jevu

Tento jev teoreticky předpověděl A. Smekal v roce 1923. Experimentální ověření publikoval v roce 1928 C. V. Raman, o něco později v tom stejném roce ještě G. C. Landsberg, L. J. Mandelštam, Y. Rocard a J. Cabannes. Za tento objev získal C. V. Raman v roce 1930 Nobelovu cenu.

Ramanův jev, neboli Ramanův rozptyl je dvoufotonový jev. Při dopadu elektromagnetického záření na molekulu je většina tohoto záření elasticky rozptýlena (tzv. Rayleighův rozptyl) a rozptýlené záření má stejnou energii a vlnovou délku jako záření dopadající. Velmi malá část dopadajícího záření (asi 1 ppm fotonů) je absorbována a okamžitě zpět vyzářena s většinou menší energií než mělo původní záření, tj. s větší vlnovou délkou. Na obr. 2.1 je znázorněn diagram energetických hladin a přechody mezi nimi typické pro jednotlivé druhy rozptylů,<sup>1</sup>



Obr. 2.1: Diagram energetických hladin.

Principem Ramanova rozptylu je tedy absorpce dopadajícího (excitačního) záření vazbou molekuly. Absorpce energie vyexcituje elektron a následně je tato energie při návratu elektronu z vyšší na nižší hladinu vyzářena. Při pokojové teplotě je většina populace elektronů molekuly v základním stavu. V případě Ramanova rozptylu se pak nejvíce uplatní Stokesův posuv, tj. elektrony nepřejdou zpět do nejnižšího stavu, ale ponechají si část energie. Vyzářený foton má pak energii menší než byla energie absorbovaného fotonu a vlnová délka se posune k červené části spektra.

Malá část elektronů se však může nacházet již před excitací na vyšší vibrační hladině, a při deexcitaci mohou přejít do základního stavu. Vyzářený foton má pak energii vyšší než absorbovaný a vlnová délka se posune k modré části spektra – anti-Stokesův posuv.

K Ramanovu rozptylu dochází okamžitě po absorpci fotonu (za méně než 1 ps), a protože tento děj probíhá na virtuálních hladinách, nezávisí tento jev na vlnové délce excitačního záření.

Ne však každá vazba v molekule je Raman aktivní. Ramanův jev může nastat pouze v případě, že polarizovatelnost molekuly je v průběhu rozptylu proměnná. Vnější elektrické pole  $\vec{E}_e$  excitačního zdroje indukuje v molekule dipólový moment  $\vec{P}$ ,<sup>1</sup>:

$$\vec{P} = \alpha \vec{E}_e, \quad (1)$$

kde  $\alpha$  je polarizovatelnost molekuly. Tento koeficient vyjadřuje, jak lehce může být elektronový mrak molekuly zdeformován vlivem vnějšího elektromagnetického pole. Jeho hodnota závisí na vzdálenosti valenčních elektronů od jádra a na delokalizaci elektronů. Jednotkou polarizovatelnosti je  $\text{Cm}^2 \text{V}^{-1}$ .

Elektrické pole vyzařované excitačním zdrojem je časově závislé:

$$\vec{E}_e = \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_e t), \quad (2)$$

kde  $\vec{E}_0$  je amplituda elektrického pole vyzařovaného zdrojem a  $\nu_e$  je frekvence záření.

Polarizovatelnost vibrující molekuly je také časově proměnná v závislosti na vibrační frekvenci molekuly  $\nu_{\text{vib}}$ :

$$\alpha = \alpha_0 + \alpha_{\text{vib}} \cos(2\pi\nu_{\text{vib}} t). \quad (3)$$

Vynásobením předchozích dvou rovnic dostaneme člen:

$$\frac{\alpha_{vib} E_0}{2} \left[ \cos 2\pi(\nu_e + \nu_{vib}) + \cos 2\pi(\nu_e - \nu_{vib}) \right]. \quad (4)$$

Tento člen reprezentuje fotony, které mohou být rozptýleny o vyšší nebo nižší frekvenci – čáry Stokesova a anti-Stokesova posuvu.

Poměr intenzity čar anti-Stokesova a Stokesova rozptylu v Ramanově spektru může být spočítán:

$$\frac{I_A}{I_S} = \left( \frac{\nu_e + \nu_{vib}}{\nu_e - \nu_{vib}} \right)^4 e^{-h\nu_{vib}/kT}, \quad (5)$$

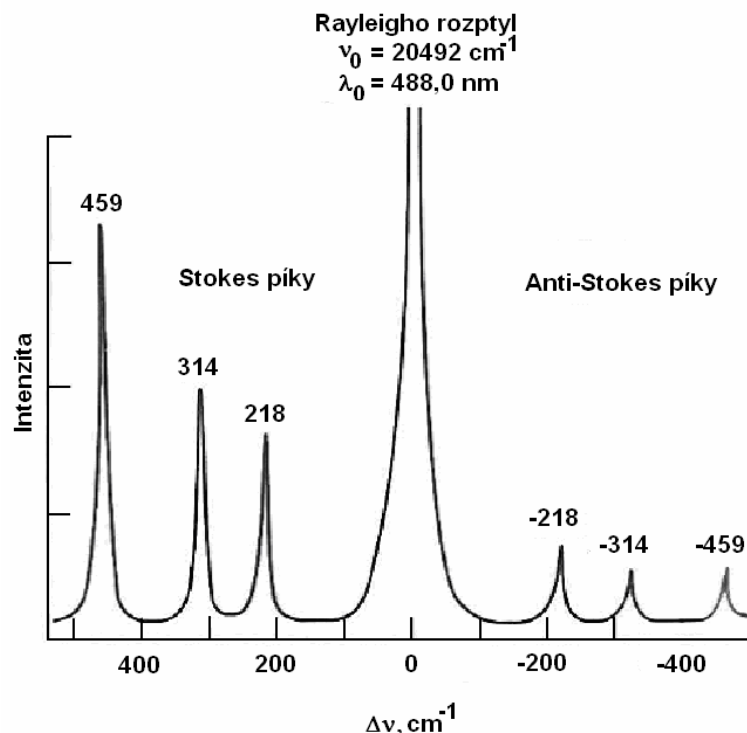
kde  $I_A$  je intenzita píku anti-Stokesova posuvu a  $I_S$  je intenzita píku Stokesova posuvu.

Ramanovo spektrum tedy obsahuje čáry Stokesova a anti-Stokesova posuvu, které se obvykle vynášejí na x-osu vlevo a vpravo od nulové hodnoty, která přísluší vlnové délce excitačního záření. Čáry Stokesova a anti-Stokesova posuvu se liší pouze v intenzitě nebo některé z nich chybí a posuv se vyjadřuje jako rozdíl reciproké vlnové délky rozptýleného záření a vlnové délky excitačního záření – vlnové číslo neboli vlnčet  $\frac{1}{\lambda}$  s jednotkou  $cm^{-1}$ .

Příklad Ramanova spektra je na obr. 2.2. Protože anti-Stokesův posuv mívá mnohem slabší intenzitu než Stokesův, zobrazuje se převážně Ramanovo spektrum právě pouze pro část Stokesova posuvu.

V Ramanově spektru látky se kromě základních čar vazeb mezi atomy molekuly mohou objevit také tzv. overtones. Jsou to harmonické násobky základních čar a jejich lineární kombinace,<sup>2</sup>.

Na vlastnostech čáry v Ramanově spektru se podílí počet oscilujících atomů v molekule, jejich prostorové uspořádání, silové pole molekuly, polarizovatelnost molekuly. Ramanovo spektrum nám dává obsáhlé informace o zkoumané látce a je pro každou látku charakteristické jako otisk prstu. Z rozboru spektra látky je možné usuzovat její strukturu. Podle intenzity píků lze provádět i kvantitativní analýzu, časová závislost spekter umožňuje kinetické studie.

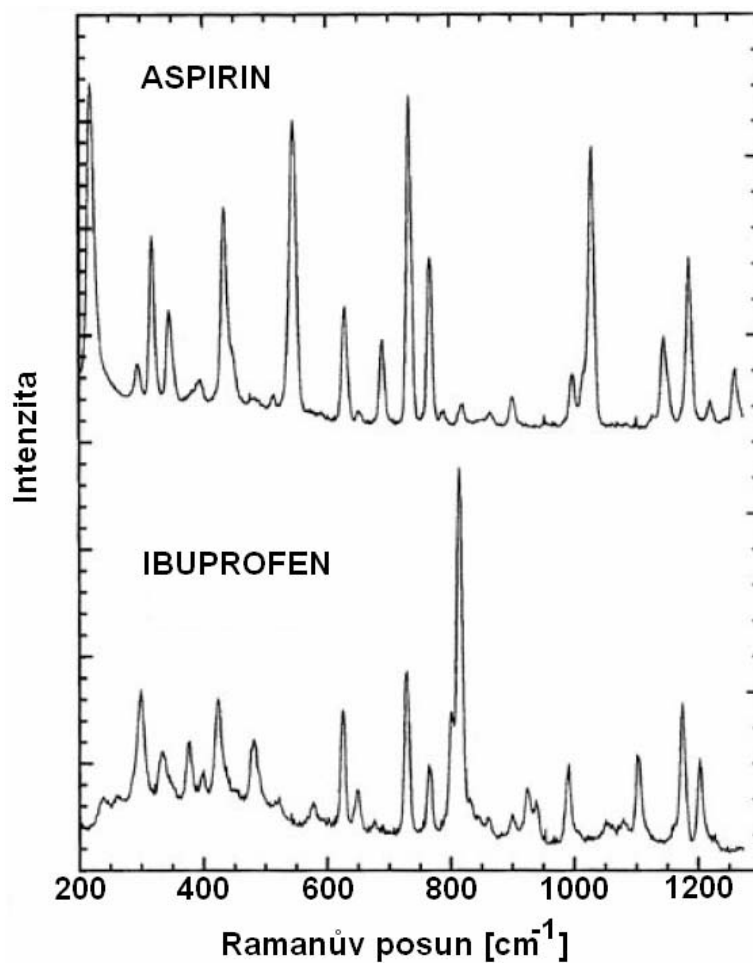


**Obr. 2.2:** Ramanovo spektrum  $\text{CCl}_4$ ,  $\text{Ar}^+$  laser na 488 nm.

Problémem RS je velmi nízká intenzita signálu. Jelikož se tato metoda hojně používá k detekci organických látek, bývá signál často překryt silnou fluorescencí, která nám znesnadňuje vyhodnocení Ramanova spektra. Nejjednodušší metodou odstranění nechtěné fluorescence je použití excitačního zdroje o takové vlnové délce, která ji nezpůsobí. Vlnové délky blízké infračervené oblasti a ultrafialové oblasti jsou vhodné. V prvním případě je energie fotonů tak malá, že k vybuzení fluorescence nedojde, současně je ale utlumen i Ramanův signál. V druhém případě sice k fluorescenci dojít může, ale ta je od užitečné části Ramanova spektra dostatečně vzdálená,<sup>3</sup>

Jinou metodou odstranění fluorescence je využití toho, že fluorescence probíhá až po uplynutí určité doby od absorpce fotonu (více než  $10^{-9}$  s). Snímáním rozptýleného záření v době před uplatněním tohoto jevu získáme pouze Ramanovo spektrum. Pro tuto metodu se používají pikosekundové a femtosekundové excitační lasery a CCD detektory se synchronizací k pulzům laseru.

Ramanova spektroskopie se stala významnou analytickou metodou, která nachází uplatnění v širokém spektru oborů, jako je antropologie, materiálová fyzika, analytická chemie, biochemie i medicína a další. Výhodou RS je možnost měřit ve vodných roztocích, protože voda má velmi slabé Ramanovo spektrum. Bez problémů je i využití vláknové optiky. Na obr. 2.3 je příklad Ramanova spektra aspirinu a ibuprofenu,<sup>4</sup>



**Obr. 2.3:** Příklad Ramanova spektra aspirinu a ibuprofenu.

V posledních desetiletích byly vyvinuty další metody založené na Ramanově rozptylu. Některé z nich jsou např.:

- rezonanční Ramanova spektroskopie – RRS,
- povrchově zesílená Ramanova spektroskopie – SERS,
- rezonanční povrchově zesílená Ramanova spektroskopie – SERRS,
- jednomolekulová povrchově zesílená Ramanova spektroskopie – SMSERS,
- na hrotu zesílená Ramanova spektroskopie – TERS,
- foto-akustická Ramanova spektroskopie – PARS,
- hyper Ramanova spektroskopie – HRS,
- koherentní antiStokes Ramanova spektroskopie – CARS,
- koherentní Stokes Ramanova spektroskopie – CSRS.

## 2.1.2 Speciální metody Ramanovy spektroskopie

### 2.1.2.1 Rezonanční Ramanova spektroskopie

Spektrum Ramanova rozptylu látky je v intenzitě velmi slabé, proto se tato metoda spektroskopie příliš neujala a k získání informací o vibračních stavech molekuly se především používá IR spektroskopie. Ne všechny vibrační stavy vazeb molekul se však projeví v IR spektru, stejně tak nejsou všechny stavy Raman aktivní. Asymetrické vibrační vazby centrálně symetrické molekuly bývají IR aktivní a Raman neaktivní, naopak symetrické vibrační vazby takové molekuly bývají IR neaktivní a Raman aktivní. V molekulách bez centra symetrie je situace složitější, ale symetrické vibrační vazby bývají většinou Raman aktivní. Proto je pro některé druhy molekul k získání úplných informací nutné použít obou metod.

Výrazné zlepšení intenzity Ramanova spektra přinesl objev rezonančního Ramanova jevu. Pokud se vibračnímu stavu molekuly dodá příslušná dávka energie taková, že se elektrony dostanou ze základního stavu do elektronově excitovaného, zvýší se intenzita rozptylu řádově  $10^3 \div 10^6$  krát. Příslušnou energii dodá molekule vhodně zvolená vlnová délka excitačního zdroje. Každému typu vazby molekuly odpovídá jiná vlnová délka. V případě složité molekuly s mnoha typy vazeb jsou ve spektru rezonančního Ramanova rozptylu při excitaci jednou vlnovou délkou viditelné pouze ty vazby, které vykazují rezonanci při použité vlnové délce.

Vezměme intenzitu klasického Ramanova rozptylu z jedné molekuly v  $90^\circ$  od svazku excitačního záření jako počet fotonů rozptýlených za sekundu. Jestliže při rozptylu dojde ke změně vibrační hladiny z počáteční  $|i\rangle$  na konečnou  $|f\rangle$  hladinu, je intenzita  $I_{fi}$  dána jako,<sup>5</sup>:

$$I_{fi}(\pi/2) = \frac{\pi^2}{\varepsilon_0^2} (\tilde{\nu}_e - \tilde{\nu}_{fi})^3 \tilde{\nu}_e I_e \sum_{\rho, \sigma} [\alpha_{\rho\sigma}]_{fi} [\alpha_{\rho\sigma}]_{fi}^*, \quad (6)$$

kde  $\varepsilon_0$  je elektrická permitivita vakua,  $\tilde{\nu}_e$  je vlnčet excitačního zdroje,  $\tilde{\nu}_e - \tilde{\nu}_{fi}$  je vlnčet rozptýleného záření,  $I_0$  je intenzita dopadajícího záření a  $[\alpha_{\rho\sigma}]$  je  $\rho\sigma$  komponenta tenzoru přechodové polarizovatelnosti. Suma je přes všechny nenulové komponenty.

Komponenty tenzoru přechodové polarizovatelnosti jsou dány rovnicí Kramers-Heisenberga:

$$[\alpha_{\rho\sigma}]_{fi} = \frac{1}{hc} \sum_{r \neq i, f} \left\{ \frac{[\mu_{\rho}]_{fr} [\mu_{\sigma}]_{ri}}{\tilde{\nu}_{ri} - \tilde{\nu}_e - i\Gamma_r} + \frac{[\mu_{\sigma}]_{fr} [\mu_{\rho}]_{ri}}{\tilde{\nu}_{rf} + \tilde{\nu}_e + i\Gamma_r} \right\}, \quad (7)$$

kde  $[\alpha_{\rho}]_{fi}$  je  $\rho$  komponenta přechodového dipólového momentu vibračního přechodu  $|f\rangle \leftarrow |r\rangle$  a  $\Gamma_r$  je činitel útlumu, který je nepřímo úměrný době života hladiny  $|r\rangle$ . Suma je obecně přes všechny hladiny molekuly.

V případě Ramanova rozptylu uvažujeme hladiny  $|i\rangle$  a  $|f\rangle$ , pak jmenovatel prvního členu může nabývat velmi malých hodnot pokud se  $\tilde{\nu}_e$  blíží  $\tilde{\nu}_{fi}$ , tj. vlnové číslo excitačního zdroje je blízké elektronovému přechodu. To může vést k radikálnímu zvětšení jedné nebo více komponent polarizovatelnosti, a tak k zvětšení intenzity Ramanova signálu – rezonanční Ramanův jev.

Vyšší intenzita RR signálu (až o  $10^6$ ) umožňuje měření látek s nižší koncentrací ( $10^{-8}$  M). Oproti tomu klasická Ramanova spektroskopie vyžaduje koncentrace vyšší než  $10^{-2}$  M. Nevýhodou RR spektroskopie je zobrazení pouze části spektra, k získání celého spektra je nutné použít široký rozsah vlnových délek excitačního zdroje. Další nevýhodou je také zvýšení rizika fluorescence a fotodegradace vzorku v důsledku zvýšení intenzity zdroje. Obě nevýhody je možné odstranit použitím vlnových délek v blízké infračervené oblasti místo viditelné,<sup>6</sup>.

Příkladem využití RR spektroskopie je měření karotenoidů, jejichž vazby (C–CH<sub>3</sub>, C–C a C=C) vykazují rezonanci při použití excitačního zdroje Ar<sup>+</sup> laseru na 488 nm. Možné využití tohoto principu v medicíně je měření obsahu karotenoidů v kůži a oční sítnici. Jde o rychlou a neinvazivní metodu,<sup>7</sup>.

### 2.1.2.2 Povrchově zesílená Ramanova spektroskopie

Povrchově zesílený Ramanův jev (SERS) byl poprvé pozorován v roce 1974 Fleischmanem a kol. Zesílený signál byl z pyridinu adsorbovaného na elektrochemicky zdrsňeném povrchu stříbrné elektrody. Nesprávně se však domnívali, že zesílení signálu bylo způsobeno zvětšením povrchu, kde se pyridin adsorboval, a tím znásobením počtu adsorbovaných molekul. Další, kdo pozoroval stejný jev, byli Van Duyne a Creighton, kteří došli k závěru, že zesílení signálu nemůže pocházet ze zvětšení počtu adsorbovaných



molekul na zdrsňeném povrchu. O rok později byla publikována práce, která přičítá zesílení signálu vybuzením povrchového plazmonu na kovovém povrchu.

Povrchový plazmon je hromadná excitace vodivostních elektronů kovových materiálů při vybuzení elektromagnetickým polem o vlnových délkách ve viditelné oblasti spektra. Za vznikem SERSu stojí dva principy: elektromagnetické zesílení a chemické zesílení. Princip prvního typu zesílení byl důkladně prostudován a popsán, zatímco princip druhého typu zesílení je stále obtížné kvalitativně i kvantitativně popsat.

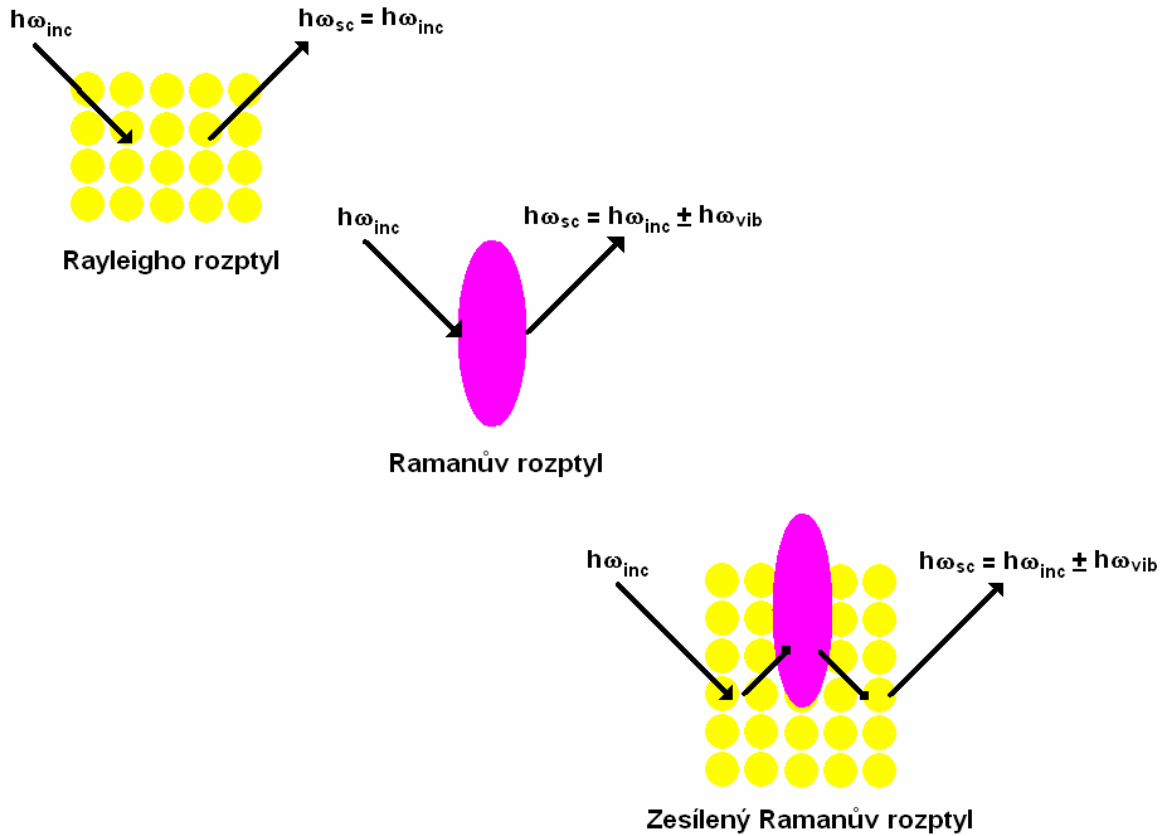
Povrchově zesílená Ramanova spektroskopie je stále více používanou analytickou metodou využívající Ramanova jevu. Vysoké zesílení signálu dovoluje měření látek o nízkých koncentracích, za speciálních podmínek umožňuje měření jednotlivých molekul. SERS je využíván v širokém spektru aplikací a je limitován pouze schopností vytvořit vhodné nanočástice a umístit měřenou látku do jejich blízkosti,<sup>8, 9, 10, 11, 12, 13</sup>.

## **Elektromagnetické zesílení**

Elektromagnetické zesílení je vyvoláno vznikem povrchového plazmonu na kovové nanočástici nebo na drsném kovovém povrchu. Povrchový plazmon je společná oscilace vodivostních elektronů kovové nanočástice a je možné ho vybudit pomocí světelného záření o vlnové délce větší než je průměr částice, tzn. kovová částice je několikrát menší než vlnová délka excitačního záření,<sup>8, 11, 15</sup>.

Při dopadu excitačního záření na kovové nanočástice, nejčastěji z mincovních kovů (Au, Ag, Cu), nebo také z alkalických kovů (Li, Na, K), dojde k vybuzení povrchového plazmonu, který ve své blízkosti zesílí elektromagnetické pole. Je-li v tomto blízkém poli molekula analytu, záření je na ni elasticky i neelasticky rozptýleno a vyzářeno. Rozptýlené záření může být znovu zesíleno povrchovým plazmonem, a tím vzniká několikanásobně zesílený signál povrchově zesíleného Ramanova jevu. Toto zesílení může dosáhnout až řádu  $10^{12}$ , některé prameny uvádí možné zesílení ještě o další dva řády vyšší,<sup>9</sup>.

Na obr. 2.4 je schematicky znázorněn rozptyl záření. V prvním případě (vlevo nahoře) jde o elastický Rayleighův rozptyl na kovových nanočásticích, kdy nedochází k posuvu vlnové délky. V druhém případě (uprostřed) je záření neelasticky rozptýleno Ramanovým jevem a dochází zde k posuvu vlnové délky buď k delším nebo kratším délkám podle vibračního stavu vazeb v molekule. V třetím případě (vpravo dole) je zesílené záření rozptýleno na adsorbované molekule a znovu zesílené, ale již s posunem vlnové délky, vyzářeno do prostoru.



**Obr. 2.4:** Schéma Rayleighova a Ramanova rozptylu elektromagnetického záření, kde žlutá znázorňuje kovové nanočástice a fialová molekulu analytu.

Vezmeme-li  $g$  jako průměrné zesílení pole na povrchu kovové nanočástice, pak průměrná velikost blízkého pole  $E_s$  vyzařované částicí bude,<sup>14</sup>:

$$E_s = gE_e, \quad (8)$$

kde  $E_s$  je průměrná velikost elektrického pole rozptýleného záření v blízké vzdálenosti od částice (tzv. *near field* oblast) a  $E_e$  je amplituda dopadajícího elektrického pole záření.

Molekula adsorbovaná na povrchu kovové nanočástice pak bude excitována polem  $E_s$  a rozptýlené záření Ramanova jevu bude úměrné:

$$E_R \propto \alpha_R E_s \propto \alpha_R g E_e, \quad (9)$$

kde  $\alpha_R$  je vhodná kombinace komponent Ramanova tenzoru.

Záření Ramanova rozptylu dále může být znovu zesíleno stejným principem jako záření excitační s faktorem  $g'$ . To znamená, že amplituda SERS pole bude dána:

$$E_{SERS} \propto \alpha_R g g' E_e, \quad (10)$$

a potom průměrná hodnota intenzity SERS signálu:

$$I_{SERS} \propto |\alpha_R|^2 |g g'|^2 I_e. \quad (11)$$

V případě, že Ramanův rozptyl bude frekvenčně málo posunut od incidenčního záření, pak  $g \cong g'$  a intenzita SERS signálu bude zesílená s čtvrtou mocninou tohoto záření.

Definujme ještě  $G$  jako poměr zesílení intenzity SERS signálu molekuly adsorbované na kovové částici a zesílení bez přítomnosti kovové částice:

$$G = \frac{|\alpha_R|}{|\alpha_{R0}|} |g g'|^2, \quad (12)$$

kde  $\alpha_{R0}$  je Ramanova polarizovatelnost izolované molekuly.

Polarizovatelnost malé kovové částice s poloměrem  $R$  a dielektrickou funkcí  $\varepsilon(\lambda)$  je:

$$\alpha = R^3 \frac{\varepsilon - 1}{\varepsilon + 2}. \quad (13)$$

Drudeho rovnice dielektrické funkce kovu modifikovaná pro přechody mezi vnitřními hladinami je:

$$\varepsilon = \varepsilon_b + 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\omega\gamma}, \quad (14)$$

kde  $\varepsilon_b$  (obecně závislé na vlnové délce) je příspěvek k dielektrické funkci z přechodu mezi hladinami,  $\omega_p$  je úhlová frekvence rezonance povrchového plazmonu kovu,  $\omega$  je úhlová frekvence excitačního záření a  $\gamma$  je stupeň elektronového rozptylu, který je nepřímo úměrný střední volné dráze elektronů a tím také nepřímo úměrný stejnosměrné konduktivitě kovu.

Kombinací *Rov. 13* s *Rov. 14* dostaneme:

$$\alpha = \frac{R^3(\varepsilon_b \omega^2 - \omega_p^2) + i\omega\gamma\varepsilon_b}{[(\varepsilon_b + 3)\omega^2 - \omega_p^2] + i\omega\gamma(\varepsilon_b + 3)}. \quad (15)$$

Reálná a imaginární část této rovnice má pól, když frekvence  $\omega$  je rovna  $\omega_R = \frac{\omega_p}{\sqrt{\varepsilon_b + 3}}$ . Šířka této rezonance je  $\gamma(\varepsilon_b + 3)$ .

Elektromagnetické zesílení je možné i na planárním hladkém a zdrsňeném povrchu. Dopadající záření interaguje s molekulou analytu a zároveň je povrchem kovu odráženo a znovu interaguje s analytem, čímž se dosáhne čtyřnásobného zesílení. K dalšímu čtyřnásobnému zesílení rozptýleného záření od analytu dojde odrazem od povrchu kovu. V případě totálně odrazivého materiálu je zesílení šestnáctinásobné.

Elektromagnetické zesílení není závislé na typu analytu, ale pouze na vlastnostech nanočástic. Tím by mělo být zesílení pro různé analyty na stejných nanočásticích shodné. Tak tomu ale není a je zřejmé, že se k elektromagnetickému zesílení přidává ještě další proces, a to chemické zesílení.

## Chemické zesílení

Tento typ zesílení Ramanova signálu je stále obestřen rouškou tajemství, neboť jeho přímé pozorování není možné a je ve většině případů překrýván elektromagnetickým zesílením, které je několikařádově vyšší. Předpokládá se, že chemické nebo také elektronické zesílení je způsobováno vazbou molekuly na povrch nanočástice a interakcí mezi nimi pomocí valenčních a vodivostních elektronů a nejspíše zde dochází k přenosu náboje. Zesílení je závislé na typu molekuly, jejím vibračním stavu, na vlastnostech nanočástice a na typu a síle vazby mezi molekulou a nanočásticí a také na případných katalytických reakcích mezi nimi. Chemické zesílení signálu se pohybuje řádově do  $10^2$ ,<sup>17</sup>.

### 2.1.2.3 Ramanova spektroskopie buněk

Ramanova spektroskopie jednotlivých buněk, jejich částí i celých tkání nachází široké uplatnění v klinické patologii, v *in vivo* a *ex vivo* zobrazování, detekci a klasifikaci mikroorganismů a ve studiu chemických procesů uvnitř buněk a ve tkáních. V posledních letech se velkou rychlostí vyvíjí diagnostické techniky Ramanovy spektroskopie pro použití v medicíně, farmakologii a v dalších příbuzných oborech,<sup>18</sup>.

Velkou výhodou těchto technik je možnost neinvazivního měření, minimální úprava vzorků, využití vláknové optiky a především vynikající molekulární senzitivita. Spojení RS s konfokální mikroskopií nám dává nástroj k zobrazení buněk a tkání s dobrou prostorovou rozlišovací schopností a současně k získávání informací o chemickém složení v jednotlivých snímaných objemech (řádově mikrometry).

Jelikož mnohé části buněk vykazují silnou fluorescenci je většina Ramanovských měření prováděna v blízké infračervené oblasti, a tím je také snížena pravděpodobnost fotodekompozice vzorku.

Současná literatura představuje RS jako potenciální diagnostickou metodu k odlišení zdravé tkáně od karcinogenní; již byly provedeny studie v této oblasti na kožních karcinogenních buňkách, karcinomu prsu, tlustého střeva a dalších s vysokou dosaženou senzitivitou i selektivitou. Počítá se i s nahrazením biopsie sondou pro RS.

Ramanova spektroskopie je také vhodná metoda k analýze krevních vzorků (měření glukózy,<sup>19</sup>, obsahu hemoglobinu v krvi,<sup>21</sup>), neinvazivnímu měření obsahu karotenoidů v kůži a v sítnici oka,<sup>7, 20</sup>.

Jako kontrastní látka k zobrazování buněk a jejich částí a současně prvek zesilující Ramanův signál se používají zlaté nanočástice. Kontrastní látky v biologickém a biomedicínckém zobrazování byly tradičně založeny na fotoabsorpci a fluorescenčních barvivech jako je malachitová zeleň nebo rodamin-6G. V nedávné době se také začalo používat kvantových teček, jejichž fluorescence je funkcí velikosti částic. Jejich nevýhodou je však častá buněčná toxicita. Naopak zlaté nanočástice profitují ze své biokompatibility, snadné přípravy a širokého spektra biochemických látek, které lze na nanočástice navázat (různé ligandy, protilátky, apod.), a tím cíleně určit, která část buňky nebo tkáně bude zobrazována s větším kontrastem,<sup>22, 23, 24, 25, 26, 27</sup>.

#### 2.1.2.4 Jednomolekulová Ramanova spektroskopie

Cílem chemické analýzy je schopnost detekovat jednotlivé molekuly a zároveň získat informace o jejich struktuře. Strukturální informace nám dává Ramanova spektroskopie, je však málo senzitivní. Teprve objev zesíleného Ramanova jevu otevřel cestu k jednomolekulové povrchově zesílené Ramanově spektroskopii (SMSERS). Současně tato metoda poskytuje rychlé výsledky, nepotřebuje žádnou speciální úpravu vzorků a je aplikovatelná na téměř všechny typy analytů. V kombinaci s konfokálním mikroskopem získáme velmi dobré prostorové rozlišení a můžeme měřit v buňkách i na chromozomech. Časové rozlišení dané délkou pulsu laseru dovoluje kinetické studie na molekulární úrovni,<sup>28, 29</sup>.

Klasický Ramanův jev nelze k detekci jedné molekuly použít kvůli velmi malému účinnému průřezu, který se pohybuje v rozmezí  $10^{-30} \div 10^{-25} \text{ cm}^2/\text{molekulu}$ , větší hodnota náleží rezonančnímu Ramanovu jevu. Aby byla intenzita Ramanova signálu měřitelná, musí být koncentrace analytu vysoká ( $10^8$  molekul). Klasický Ramanův signál je závislý na účinném průřezu Ramanova rozptylu, intenzitě záření excitačního zdroje a na počtu molekul,<sup>30</sup>:

$$I_s(\nu_s) = M I_e(\nu_e) \sigma_{\text{free}}^R, \quad (16)$$

kde  $I_s(\nu_s)$  je intenzita záření Ramanova rozptylu,  $M$  je počet molekul o Ramanově účinném průřezu  $\sigma_{\text{free}}^R$  a  $I_e(\nu_e)$  je intenzita excitačního záření.

Chceme-li měřit velmi malé koncentrace látek, tj.  $M$  je malé číslo, musíme mít zákonitě velké hodnoty předešlých dvou parametrů. Dnešní laserové zdroje se vyznačují vysokými operačními výkony a klastry kovových nanočástic dokáží zvýšit účinný průřez. Intenzita SERS signálu je pak:

$$I_{\text{SERS}}(\nu_s) = M I_e(\nu_e) |A(\nu_e)|^2 |A(\nu_s)|^2 \sigma_{\text{ads}}^R, \quad (17)$$

kde  $A$  značí faktor elektromagnetického zesílení záření laseru a rozptýleného záření a  $\sigma_{\text{ads}}^R$  je Ramanův účinný průřez zesílený adsorbováním molekuly na kovovou nanočástici (chemické zesílení).

Vysoká intenzita SERS signálu odstraňuje problém malé senzitivity a blíží se senzitivě fluorescenčních metod. V kombinaci se strukturálními informacemi poskytovanými Ramanovým jevem získáváme mocný nástroj k detekci látek na úrovni jedné molekuly. Za vhodných podmínek jsou měřitelné analyty v koncentracích  $10^{-7} \div 10^{-12}$  M.

Kritickým bodem SMSERS je výroba stabilního a reprodukovatelného SERS-aktivního substrátu s vysokým zesílením. Běžně dostupné SERS substráty pro analytické účely mají malý faktor zesílení od  $10^3$  do  $10^6$ , které je možné zvýšit dosažením podmínek pro rezonanční povrchově zesílený Ramanův jev (SERRS),<sup>31</sup>.

K jednomolekulové analýze pomocí SERS se používají dva přístupy. Prvním je získání extrémně velkých hodnot účinného průřezu díky klastrům koloidních částic a zdrojem excitačního záření v blízké infračervené oblasti. Druhým je vybuzení rezonance v uspořádání jedna nanočástice – jedna molekula. Velmi důležitým faktorem v obou případech je, že množství molekul analytu není větší než počet malých klastrů nanočástic. Na každém klastru by měla být nanejvýš jedna molekula analytu. Snímání se provádí ve femtolitrových objemech.

Jednou z nejzajímavějších aplikací SMSERS je rychlé sekvenování DNA s detekcí a identifikací jednotlivých nukleotidů. NIR-SMSERS má oproti fluorescenční metodě výhodu, že není potřeba jednotlivé báze značit fluorescenčními barvivy. Např. pro adenosin monofosfát a adenin na stříbrných koloidních klastrech je Ramanův účinný průřez přibližně roven  $10^{-16}$  cm<sup>2</sup>/molekulu.

#### **2.1.2.4 Další speciální metody Ramanovy spektroskopie**

##### **CARS**

CARS je zkratka anglického názvu Coherent anti-Stokes Raman Spectroscopy. Koherentní anti-Stokesův Ramanův rozptyl je nelineární proces směšování čtyř vlnění.

Bloembergen v roce 1956 vytvořil základní popis reakce materiálu na elektrické pole,<sup>33</sup>:

$$\bar{P} = \chi^{(1)}\bar{E}_1 + \chi^{(2)}\bar{E}_1\bar{E}_2 + \chi^{(3)}\bar{E}_1\bar{E}_2\bar{E}_3, \quad (18)$$

kde  $\bar{P}$  je polarizace, která je v lineární optice lineárně závislá na elektrickém poli záření  $\bar{E}_1$  a dielektrické susceptibilitě  $\chi^{(1)}$ . Tato lineární část rovnice (první člen) odpovídá všem lineárním optickým jevům jako lom, odraz, absorpce atd. Dosazením do rovnice hodnoty jednoho nebo dvou externích elektrických polí vysokých hodnot intenzity (1÷20 kV/cm) získáme nelineární optické jevy. Vysoké hodnoty intenzity elektrického pole kompenzují velmi malé hodnoty  $\chi^{(i)}$ . Tím je také dáno, proč nejsou nelineární jevy v denním životě rozpoznatelné, protože sluneční záření má hodnotu intenzity elektrického pole okolo 6 V/cm.

Vývoj laserových zdrojů koherentního záření o vysokých intenzitách dovolil studium nelineárních optických jevů. Použitím fokusovaného svazku pulzního laseru dosáhneme, že nelineární jevy budou srovnatelné s lineárními.

CARS proces je založený na třetím členu rovnice Rov. 18. Tento člen způsobuje frekvenční kombinace tří příchozích vln, např.:  $2\omega_{pm} - \omega_s$ , což je základ CARS procesu. Máme dva svazky „pump“ excitačního záření o  $\omega_{pm}$  a jeden svazek Stokesova excitačního záření o  $\omega_s$ . Jejich interakcí ve vzorku získáme anti-Stokesův signál o  $\omega_{as} = 2\omega_{pm} - \omega_s$ . Podmínkou vzniku anti-Stokesova signálu je, že rozdíl frekvencí  $\omega_{pm}$  a  $\omega_s$  musí být roven frekvenci vibračního stavu molekuly.

Intenzita CARS signálu je závislá na čtverci koncentrace analytu. Tento proces se také vyznačuje výbornou prostorovou i časovou rozlišovací schopností při měření vibračních stavů molekul. Prostorové rozlišení je dáno úhlem překrývání excitačních svazků a průměrem jejich stop. Časové rozlišení je dáno frekvencí pulzů laserů (často se používají femto- a pikosekundové laserové zdroje). Kritickým bodem je sfázování pulzů laserů.

CARS je vynikající metoda pro měření lokálních koncentrací látek. Například pro plynnou fázi se CARS používá k měření lokálních koncentrací a teplot při hoření, využívá se k měření koncentrace intracelulární vody v jedné buňce, hydrodynamiky mikroorganismů apod.,<sup>34, 35</sup>.

## TERS

TERS znamená na hrotu zesílený Ramanův rozptyl. V podstatě je to modifikovaná metoda *atomic force* mikroskopie (AFM). Instrumentace TERSu je kombinace



konfokálního skenovacího mikroskopu a AFM hrotu přizpůsobeného pro SERS. Konfokální mikroskop poskytuje optické zarovnání laserového svazku k hrotu.

Nejčastější uspořádání je, že z jedné strany vzorku na skleněné podložce je přiložen AFM hrot a z druhé strany přes konfokální mikroskop dopadá laserový svazek. Na AFM hrotu jsou nanесeny stejné nanočástice jako pro SERS nebo napařená kovová vrstva. Jako vhodný podpůrný materiál pod Ag nanočástice a laser na 488 nm se ukázaly být materiály s nízkým refrakčním indexem jako jsou  $\text{SiO}_x$  a  $\text{AlF}_3$ ,<sup>36, 37</sup>.

## 2.1.3 Nanočástice pro SERS

### 2.1.3.1 Kovové nanočástice

Pro SERS se nejvíce hodí nanočástice z mincovních kovů, jako je zlato, stříbro a měď. Dobré parametry mají také alkalické kovy jako lithium, sodík a draslík. Používají se také nanočástice s jádrem z jiného materiálu, nejčastěji dielektrického. Velkou výhodou výše zmíněných materiálů jsou vynikající optické vlastnosti v oblasti viditelného světla a v blízké infračervené oblasti. Výroba koloidních částic různých tvarů i planárních povrchů je jednoduchá a technicky méně náročná. Změnou parametrů při výrobě nanočástic můžeme měnit jejich tvar (koule, trojúhelníky, tyčinky) a rozměry podle potřeb aplikace a podle toho se mění i jejich frekvence povrchového plazmonu,<sup>38</sup>.

Izolované nanočástice dokáží zesílit Ramanův signál až  $10^7$  krát. Ještě větší zesílení poskytují klastry nanočástic a to okolo  $10^8$ . Toto velké zesílení však vzniká pouze v místě, kde se nanočástice přibližují k sobě na vzdálenost v jednotkách nanometrů. Podobně velkého zesílení lze dosáhnout na částicích s ostrými hranami (hranoly) a silně zakřivenými plochami („nanorice“),<sup>39</sup>.

Zlaté nanočástice lze s výhodou použít pro biomedicínské aplikace, mají totiž vynikající biokompatibilitu, váží se na řadu ligandů, protilátek a další biologicky významné látky. Jejich navázáním na vhodné látky je možné provádět Ramanovu mikroskopii buněk, jejich částí i tkání, čímž nachází tato metoda uplatnění v diagnostice karcinomů a jiných onemocnění. Zlaté nanočástice se však používají i v dalších optických diagnostických technikách i ve fototermální terapii.<sup>40, 41, 42, 43</sup>

Jak bylo poznamenáno výše, vznik SERS je podmíněn vznikem povrchového plazmonu na kovových částicích a ten je silně závislý na velikosti nanočástic, jejich tvaru,

dielektrických vlastnostech a na obklopujícím prostředí. Optické vlastnosti nanočástic tedy můžeme řídit vhodným výběrem jejich tvaru a velikosti,<sup>44, 45, 46</sup>. Pro teoretické studie optických vlastností nanočástic se používá množství různých přístupů jako např. Mieho teorie a numerické metody jako je DDA (Discrete Dipole Approximation) metoda nebo metoda FDTD (Finite Difference Time Domain). Pomocí nich se počítají různé charakteristiky, především absorpční ( $Q_{abs}$ ) a rozptylové ( $Q_{sca}$ ) účinnosti a vlnová délka optické rezonance ( $\lambda_{max}$ ).

Pro kulové homogenní nanočástice se využívá Mieho teorie, podle které je účinnost rozptylu ( $Q_{sca}$ ) a zhášení ( $Q_{ext}$ ) dána nekonečnou řadou,<sup>47, 48</sup>:

$$Q_{ext} = \frac{2}{x^2} \sum_{n=1}^{\infty} (2n+1) \text{Re}[a_n + b_n], \quad (19)$$

$$Q_{sca} = \frac{2}{x^2} \sum_{n=1}^{\infty} (2n+1) [a_n^2 + b_n^2], \quad (20)$$

$$Q_{abs} = Q_{ext} - Q_{sca}, \quad (21)$$

$$a_n = \frac{m \psi_n(mx) \psi_n'(x) - \psi_n(x) \psi_n'(mx)}{m \psi_n(mx) \xi_n'(x) - m \xi_n(x) \psi_n'(mx)}, \quad (22)$$

$$b_n = \frac{\psi_n(mx) \psi_n'(x) - m \psi_n(x) \psi_n'(mx)}{\psi_n(mx) \xi_n'(x) - m \xi_n(x) \psi_n'(mx)}, \quad (23)$$

kde  $m$  je poměr indexu lomu koule  $n$  a obklopujícího prostředí  $n_m$ ,  $x$  je parametrem velikosti částice daný  $2\pi m R / \lambda$ ,  $\psi_n$  a  $\xi_n$  jsou Ricatti-Bessel funkce a  $\psi_n'$ ,  $\xi_n'$  jsou jejich první derivace podle argumentu v závorce.

Mieho teorie je aplikovatelná pouze na částice kulového tvaru a na kulové částice s jádrem z jiného materiálu. Bylo vyvinuto několik numerických metod, které jsou schopny modelovat optické vlastnosti nanočástic různých tvarů a složení. Mezi tyto metody patří např:

- DDA (Discrete Dipole Approximation) metody,

- MMP (Multiple Multipole Methods) metody,
- FDTD (Finite Difference Time Domain) metody,
- metody T-matice a další.

Nejčastěji se používají metody DDA a FDTD, které jsou jako software komerčně dostupné, a s jejichž pomocí se vypočítávají elektromagnetická pole v mnoha odvětvích, např.: působení elektromagnetických polí na tkáň, šíření elektromagnetického pole od antény, geomagnetické pole atd.

### **2.1.3.2 Modelování optických vlastností částic**

#### **DDA metoda**

Tato metoda je široce rozvíjena v několika posledních letech za účelem modelování optických vlastností (rozptyl a absorpce elektromagnetických vln) nanočástic různých tvarů a složení, neboť klasické řešení problému pomocí Maxwellových rovnic je vhodné pouze pro kulové částice. Základem metody je reprezentace objektu libovolného tvaru kubickou mřížkou o  $N$  polarizovatelných bodových dipólů, jejichž poloha je určena pomocí vektoru  $\vec{r}_i$ ,  $i=1, 2, \dots, N$ , a každý dipól je charakterizován polarizovatelností  $\alpha_i$ ,<sup>49</sup>. Každý dipól interaguje se všemi ostatními dipóly a ozařujícím elektromagnetickým polem.

DDA metoda vede k soustavě lineárních rovnic, jejichž vyřešením se získají dipólové polarizace, z nichž lze následně získat další rozptylové veličiny. Tato metoda zjednodušuje Maxwellovy rovnice na algebraický tvar a s využitím rychlé Fourierovy transformace (FFT) a metody komplexně konjugovaných gradientů se stává velmi efektivní.

Předpokládejme, že nanočástice je dielektrická a nemagnetická ( $\mu=1$ ) a její elektrická permitivita je izotropická. Objekt je ozařen monochromatickou rovinnou vlnou,<sup>49, 50, 51, 52</sup>:

$$\vec{E}_{inc}(\vec{r}t) = \vec{E}_0 e^{ik \cdot \vec{r} - i\omega t}, \quad (24)$$

kde  $\vec{r}$  je vektor pozice,  $t$  je čas,  $\omega$  je úhlová frekvence,  $\vec{k} = \omega/c = 2\pi/\lambda$  je vektor vlny,  $c$  je rychlost světla a  $\lambda$  je vlnová délka incidenčního záření.

Rovinná vlna indukuje dipólový moment:

$$\vec{P}_i = \alpha_i \cdot \vec{E}_{loc,i}. \quad (25)$$

Každý dipól systému se nachází v elektrickém poli složeném ze dvou složek: incidenční pole záření  $\vec{E}_{inc,i}$  a pole vyzařované ostatními dipóly  $\vec{E}_{dip,i}$ . Lokální pole dipólu je tedy dáno:

$$\vec{E}_{loc,i} = \vec{E}_{inc,i} + \vec{E}_{dip,i} = \vec{E}_0 e^{i\vec{k} \cdot \vec{r}_i} - \sum_{i \neq j} \vec{A}_{ij} \cdot \vec{P}_j, \quad (26)$$

kde  $\vec{A}_{ij}$ , když  $i \neq j$ , je  $3N \times 3N$  matice interakcí:

$$\vec{A}_{ij} \cdot \vec{P}_j = \frac{e^{ikr_{ij}}}{r_{ij}^3} \left\{ k^2 \vec{r}_{ij} \times (\vec{r}_{ij} \times \vec{P}_j) + \frac{(1 - ikr_{ij})}{r_{ij}^2} [r_{ij}^2 \vec{P}_j - 3\vec{r}_{ij} (\vec{r}_{ij} \cdot \vec{P}_j)] \right\}, \quad (27)$$

kde  $\vec{r}_{ij}$  je vektor od dipólu  $i$  k dipólu  $j$  a  $r_{ij} \equiv |\vec{r}_i - \vec{r}_j|$ .

Vektory polarizace získáme vyřešením  $3N$  lineárních rovnic:

$$\sum_{j=1}^N \vec{A}_{ij} \vec{P}_j = \vec{E}_{inc,i}, \quad (28)$$

kde elementy matice  $\vec{A}_{ii}$  na diagonále jsou rovny  $\alpha_i^{-1}$ .

Rovnici 27 je možné přepsat do tvaru:

$$\vec{A}_{ij} \vec{P}_j = f(r_{ij}) \vec{P}_j + g(r_{ij}) \vec{n}_{ij} (\vec{n}_{ij} \cdot \vec{P}_j), \quad (29)$$

kde  $\vec{n}_{ij} = \vec{r}_{ij} / r_{ij}$ .

Funkce  $f(r_{ij})$ ,  $g(r_{ij})$  a jejich suma jsou:

$$f(r_{ij}) = -\exp(ikr_{ij}) \left( \frac{k^2}{r_{ij}} + \frac{ik}{r_{ij}^2} - \frac{1}{r_{ij}^3} \right), \quad (30)$$

$$g(r_{ij}) = -\exp(ikr_{ij}) \left( -\frac{k_2}{r_{ij}} - \frac{3ik}{r_{ij}^2} + \frac{3}{r_{ij}^3} \right), \quad (31)$$

$$h(r_{ij}) = f(r_{ij}) + g(r_{ij}) = \exp(ikr_{ij}) \left( \frac{2ik}{r_{ij}^2} - \frac{2}{r_{ij}^3} \right). \quad (32)$$

Absorpční účinný průřez a účinný průřez zhášení definovaného cíle ozáření jsou definovány:

$$C_{abs} = \frac{4\pi k}{|\bar{E}_0|^2} \sum_{i=1}^N \left\{ \text{Im} \left[ \bar{P}_i \bullet (\alpha_i^{-1})^* \bar{P}_i^* - \frac{2}{3} k^3 |\bar{P}_i|^2 \right] \right\}, \quad (33)$$

$$C_{ext} = \frac{4\pi k}{|\bar{E}_0|^2} \sum_{i=1}^N \text{Im}(\bar{E}_{inc,i}^* \bullet \bar{P}_i), \quad (34)$$

kde \* značí komplexně sdružený vektor nebo matici. Účinný průřez rozptylu je pak roven  $C_{ext} - C_{abs}$ .

Absorpční, rozptylová a zhášecí účinnost jsou:

$$Q_{abs} = \frac{C_{abs}}{A}, \quad Q_{scat} = \frac{C_{scat}}{A}, \quad Q_{ext} = \frac{C_{ext}}{A}, \quad (35)$$

kde  $A = \pi a_{eff}^2$  a  $a_{eff}$  je definována přes efektivní objem rovný  $4\pi a_{eff}^3 / 3$ .

Elektromagnetický příspěvek k intenzitě SERS signálu lze získat vyčíslením lokálního pole  $\bar{E}_{loc,i}(\omega)$ . Faktor zesílení elektromagnetickým polem:

$$F(\omega) = \frac{\langle |\bar{E}_{loc,i}(\omega)|^2 \rangle}{\bar{E}_0^2}, \quad (36)$$

kde lomené závorky značí průměr přes celý povrch částice. Faktor zesílení SERS zahrnuje faktory zesílení pole pro frekvence záření incidenčního a Stokesova posuvu:

$$R(\omega, \omega') = F(\omega)F(\omega'). \quad (37)$$

## FDTD metoda

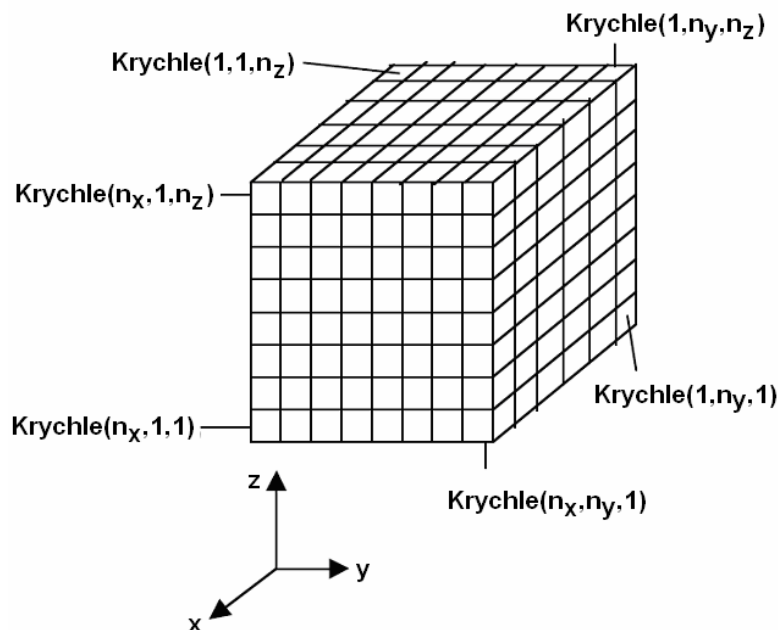
Metoda FDTD je algoritmus pro řešení Maxwellových rovnic ve tvaru parciálních derivací v čase. Tyto rovnice jsou zdiskretizovány pomocí aproximace centrálních diferencí v prostoru i čase a výsledkem jsou rovnice konečných diferencí. Tato metoda je využívána především pro řešení problémů šíření, vyzařování a rozptyl elektromagnetických vln.

Jako první ji použil pro svou práci Kane S. Yee v roce 1966 od této doby byla metoda modifikována pro různé oblasti řešení problémů šíření elektromagnetických vln. V současné době je na trhu několik softwarových prostředků určených pro specifické aplikace jako je rádiové šíření vln, geomagnetické pole, fotonové vlnovody a mnoho dalších.

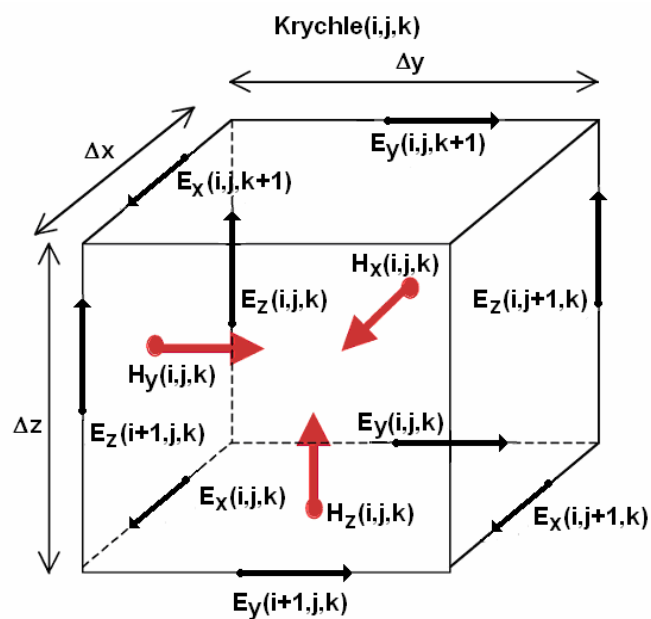
Maxwellovy rovnice jsou,<sup>53, 54, 55, 56, 57</sup>:

$$\begin{aligned} \nabla \times \bar{E} &= -\frac{\partial}{\partial t} \bar{B} \\ \nabla \times \bar{H} &= \bar{J} + \frac{\partial}{\partial t} \bar{D}, \\ \nabla \bar{D} &= \rho \\ \nabla \bar{B} &= 0 \end{aligned} \quad (38)$$

kde  $\rho$  je objemová hustota náboje,  $\bar{J}$  objemová hustota proudu,  $\bar{D}$  vektor elektrické indukce,  $\bar{E}$  vektor elektrického pole,  $\bar{B}$  vektor hustoty magnetického toku a  $\bar{H}$  vektor magnetického pole. Všechny vektory jsou funkcí prostoru a času  $(\vec{r}, t)$ . Pro izotropické, lineární a nedisperzní prostředí platí, že  $\bar{D} = \varepsilon \bar{E}$  a  $\bar{B} = \mu \bar{H}$ , kde  $\varepsilon$  je permitivita a  $\mu$  permeabilita prostředí jako konstanty.



**Obr. 2.5:** Yeeho diskretizovaný prostor o  $N_x \times N_y \times N_z$  počtu krychlí.



**Obr. 2.6:** Yeeho jednotková krychle  $(i,j,k)$  diskretizovaného 3D prostoru.

FDTD metoda využívá diskretizace prostoru do ortogonální kubické mřížky (viz. Obr. 2.5 a 2.6), kde je každá komponenta polí vyhodnocena v jednotlivých prostorových pozicích. Vektory elektrického a magnetického pole jsou získány v časových okamžicích zpožděných o polovinu vzorkovacího intervalu. Materiál, jehož vlastnosti zkoumáme, je charakterizován svými konstantami v každém bodu mřížky.

Pro izotropické prostředí jsou rotační Maxwellovy rovnice:

$$\begin{aligned}\nabla \times \bar{E} &= -\mu \frac{\partial \bar{H}}{\partial t} \\ \nabla \times \bar{H} &= \sigma \bar{E} + \varepsilon \frac{\partial \bar{E}}{\partial t},\end{aligned}\tag{39}$$

které lze přepsat do šesti skalárních rovnic v kartézském souřadném systému:

$$\begin{aligned}\frac{\partial H_x}{\partial t} &= \frac{1}{\mu} \left( \frac{\partial E_y}{\partial z} - \frac{\partial E_z}{\partial y} \right) \\ \frac{\partial H_y}{\partial t} &= \frac{1}{\mu} \left( \frac{\partial E_z}{\partial x} - \frac{\partial E_x}{\partial z} \right), \\ \frac{\partial H_z}{\partial t} &= \frac{1}{\mu} \left( \frac{\partial E_x}{\partial y} - \frac{\partial E_y}{\partial x} \right)\end{aligned}\tag{40}$$

$$\begin{aligned}\frac{\partial E_x}{\partial t} &= \frac{1}{\varepsilon} \left( \frac{\partial H_z}{\partial y} - \frac{\partial H_y}{\partial z} - \sigma E_x \right) \\ \frac{\partial E_y}{\partial t} &= \frac{1}{\varepsilon} \left( \frac{\partial H_x}{\partial z} - \frac{\partial H_z}{\partial x} - \sigma E_y \right), \\ \frac{\partial E_z}{\partial t} &= \frac{1}{\varepsilon} \left( \frac{\partial H_y}{\partial x} - \frac{\partial H_x}{\partial y} - \sigma E_z \right)\end{aligned}\tag{41}$$

Sít' souřadnic Yeeho krychle  $(i, j, k)$  je:

$$(i, j, k) = (i\Delta x, j\Delta y, k\Delta z),\tag{42}$$

kde  $\Delta x, \Delta y, \Delta z$  jsou vzdálenosti mezi body mřížky.

Jakákoli funkce v čase a prostoru může být zapsána:

$$F^n(i, j, k) = F(i\Delta x, j\Delta y, k\Delta z, n\Delta t),\tag{43}$$



kde  $\Delta t$  je inkrement v čase,  $n$  je index času a  $\delta = \Delta x = \Delta y = \Delta z$ , pak prostorové a časové derivace funkce  $F$  zapsané pomocí aproximace centrálních konečných diferencí:

$$\frac{\partial F^n(i, j, k)}{\partial x} = \frac{F^n(i, j, k) - F^n(i-1, j, k)}{\delta}, \quad (44)$$

$$\frac{\partial F^n(i, j, k)}{\partial t} = \frac{F^{n+1/2}(i, j, k) - F^{n-1/2}(i, j, k)}{\Delta t}. \quad (45)$$

Aplikováním rovnic *Rov. 44* a *Rov. 45* na rovnice *Rov. 40* a *Rov. 41* dostaneme:

$$\begin{aligned} E_x^{n+1}(i, j, k) = & A_{i,j,k} E_x^n(i, j, k) + B_{i,j,k} [H_z^{n+1/2}(i, j, k) - H_z^{n+1/2}(i, j-1, k)] \\ & + B_{i,j,k} [H_y^{n+1/2}(i, j, k-1) - H_y^{n+1/2}(i, j, k)], \end{aligned} \quad (46)$$

$$\begin{aligned} E_y^{n+1}(i, j, k) = & A_{i,j,k} E_y^n(i, j, k) + B_{i,j,k} [H_x^{n+1/2}(i, j, k) - H_x^{n+1/2}(i, j, k-1)] \\ & + B_{i,j,k} [H_z^{n+1/2}(i-1, j, k) - H_z^{n+1/2}(i, j, k)], \end{aligned} \quad (47)$$

$$\begin{aligned} E_z^{n+1}(i, j, k) = & A_{i,j,k} E_z^n(i, j, k) + B_{i,j,k} [H_y^{n+1/2}(i, j, k) - H_y^{n+1/2}(i-1, j, k)] \\ & + B_{i,j,k} [H_x^{n+1/2}(i, j-1, k) - H_x^{n+1/2}(i, j, k)], \end{aligned} \quad (48)$$

$$\begin{aligned} H_x^{n+1/2}(i, j, k) = & H_x^{n-1/2}(i, j, k) + \frac{\Delta t}{\mu \delta} [E_y^n(i, j, k+1) - E_y^n(i, j, k)] \\ & + \frac{\Delta t}{\mu \delta} [E_z^n(i, j, k) - E_z^n(i, j+1, k)], \end{aligned} \quad (49)$$

$$\begin{aligned} H_y^{n+1/2}(i, j, k) = & H_y^{n-1/2}(i, j, k) + \frac{\Delta t}{\mu \delta} [E_z^n(i+1, j, k) - E_z^n(i, j, k)] \\ & + \frac{\Delta t}{\mu \delta} [E_x^n(i, j, k) - E_x^n(i, j, k+1)], \end{aligned} \quad (50)$$

$$H_z^{n+1/2}(i, j, k) = H_z^{n-1/2}(i, j, k) + \frac{\Delta t}{\mu \delta} [E_x^n(i, j+1, k) - E_x^n(i, j, k)] + \frac{\Delta t}{\mu \delta} [E_y^n(i, j, k) - E_y^n(i+1, j, k)], \quad (51)$$

$$A_{i,j,k} = \frac{2\varepsilon(i, j, k) - \sigma(i, j, k)\Delta t}{2\varepsilon(i, j, k) + \sigma(i, j, k)\Delta t}, \quad (52)$$

$$B_{i,j,k} = \frac{2\Delta t}{(2\varepsilon(i, j, k) - \sigma(i, j, k)\Delta t)\delta}. \quad (53)$$

Všechny komponenty vektorů  $\bar{E}$  a  $\bar{H}$  jsou počítány v různých polovinách vzorkovacího času pomocí výše uvedených rovnic a za interval  $\Delta t$  získáme všechny hodnoty komponent obou vektorů.

Abychom pomocí metody FDTD získali přesné výsledky, musí být velikost mřížky  $\delta$  menší než vlnová délka incidentního záření, obvykle se volí  $\lambda/10$ . Podmínky stability metody jsou závislé na zvoleném vzorkovacím čase a velikosti mřížky. Musí platit Courantovo kritérium:

$$u_{\max} \Delta t = \left( \frac{1}{\Delta x^2} + \frac{1}{\Delta y^2} + \frac{1}{\Delta z^2} \right)^{-\frac{1}{2}}, \quad (54)$$

kde  $u_{\max}$  je maximální rychlost vlny záření, a pokud je  $\delta$  ve všech směrech stejná, pak je podmínka stability:

$$\frac{u_{\max} \Delta t}{\delta} = \frac{1}{\sqrt{D}}, \quad (55)$$

kde  $D$  je počet dimenzí řešeného problému.

V případě zdroje kontinuálního sinusového záření je působící pole ve formě:

$$E_{inc}(x, y, z) = E_0(x, y, z) \sin(\omega t), \quad (56)$$

diskrétní forma pole planární vlny o frekvenci  $f$ :

$$E_{inc,x}(i,j,k_s) = E_0(i,j,k_s) \sin(2\pi f n \Delta t), \quad (57)$$

za předpokladu, že dopadající záření má pouze složky  $E_x$  a působí na všechny body roviny  $z=k_s$ . V každém časovém kroku je hodnota  $E_{inc,x}(i,j,k_s)$  přičtena k  $E_x^n(i,j,k_s)$ .

Vektory celkových polí jsou dány:

$$\begin{aligned} \bar{E}_{tot} &= \bar{E}_{inc} + \bar{E}_{scat} \\ \bar{H}_{tot} &= \bar{H}_{inc} + \bar{H}_{scat} \end{aligned}, \quad (58)$$

kde *scat* znamená, že jde o pole rozptylu.

Jelikož se při výpočtu pohybujeme v konečném prostoru, je pro získání správných výsledků bezpodmínečně nutné stanovit okrajové podmínky, které zajistí zdání nekonečného prostoru, kam se mohou odražené vlny šířit. V opačném případě dojde k nesprávným odrazům na okrajích prostoru.

Jednou z mnoha okrajových podmínek je Murova absorpční podmínka vhodná pro 3D FDTD, která simuluje šíření vln do okolí. Všechny komponenty polí musí splňovat rovnici:

$$\nabla^2 \psi + \frac{1}{u^2} \frac{\partial^2 \psi}{\partial t^2} = 0, \quad (59)$$

kde  $\psi$  je jakákoli komponenta polí a  $u$  je rychlost šíření vlny.

Jako příklad vezměme komponentu elektrického pole  $E_z$  v  $x=0$ , pak Murova okrajová podmínka prvního řádu je:

$$E_z^{n+1}(0,j,k) = E_z^n(1,j,k) + \frac{c\Delta t - \delta}{c\Delta t + \delta} [E_z^{n+1}(1,j,k) - E_z^n(0,j,k)], \quad (60)$$

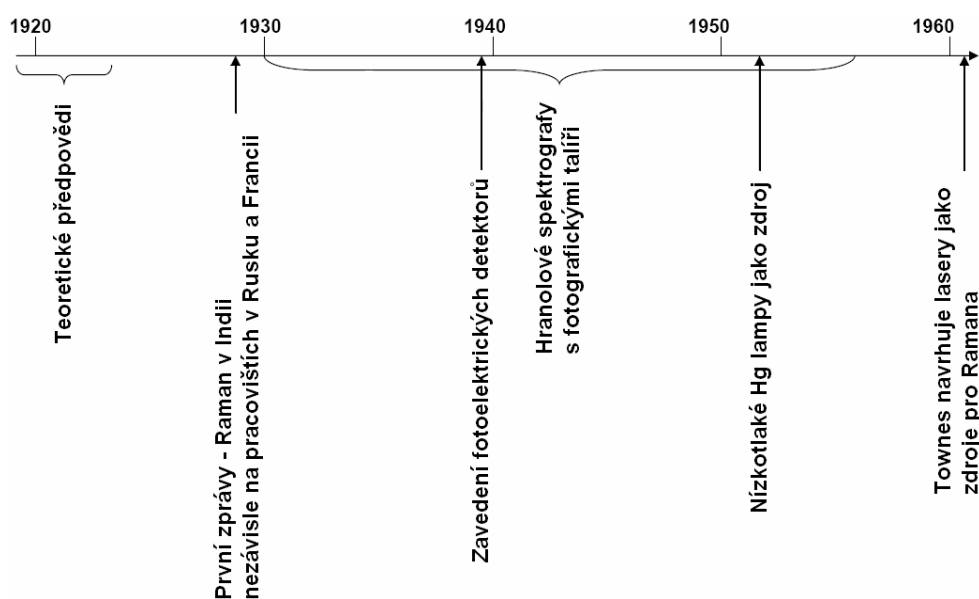
kde  $c$  je rychlost světla. Přesnější výsledky jsou dosaženy použitím konečných diferencí druhého řádu.

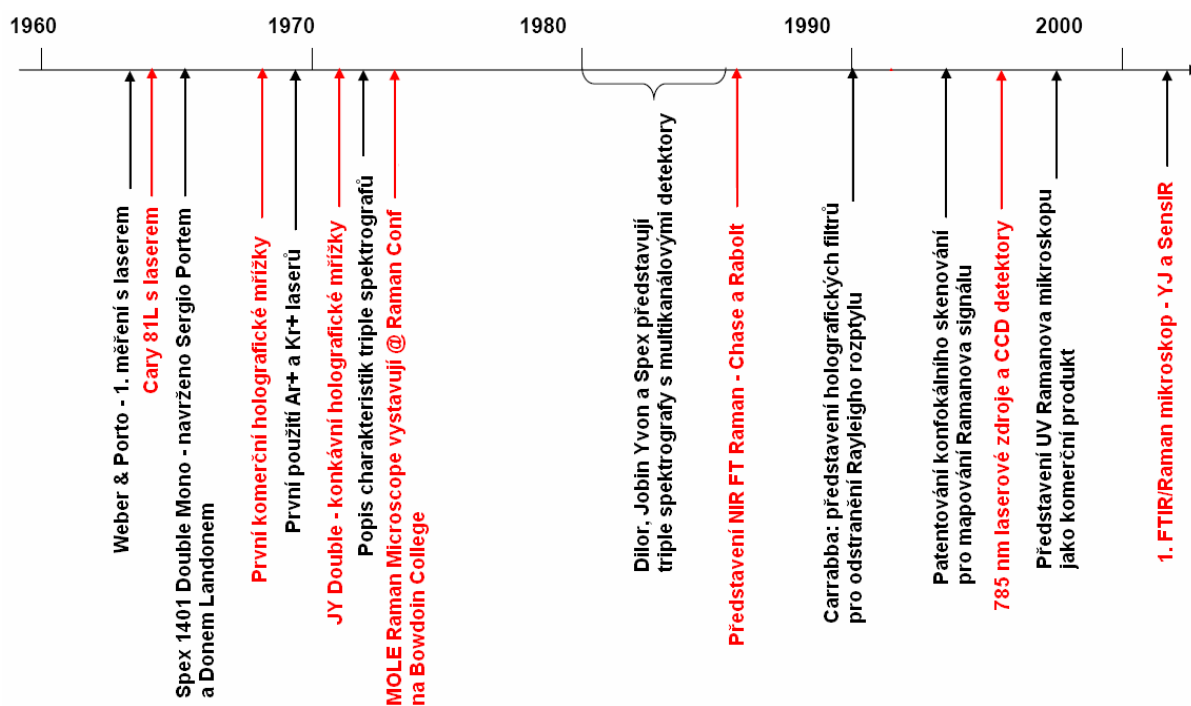
## 2.2 INSTRUMENTACE PRO RAMANOVU SPEKTROSKOPII

Ramanova spektroskopie dosahuje nebývalého rozmachu díky vývoji nových technologií, které výrazně zlepšují selektivitu i senzitivitu metody až k hranici detekce jedné molekuly. V šedesátých a sedmdesátých letech se začaly pro RS používat jako zdroje záření lasery a velmi rychle vytlačily do té doby používané výbojky. Monochromaticnost zdroje a vysoké intenzity záření jsou některé z klíčových podmínek k dosažení dobrých výsledků v RS. Na obr. 2.7 je znázorněn historický vývoj používané instrumentace pro RS,<sup>58</sup>.

Další zlom ve vývoji technik Ramanovy spektroskopie znamenala aplikace CCD detektorů, jejichž vlastnosti a různé technologie zesilování jasu, snižování různých druhů šumů a možné hradlování, umožnily, kromě jiných, i kinetické studie.

Ramanova spektroskopii těží z možnosti použití této metody v široké oblasti spektra záření, a to od ultrafialové přes celou viditelnou oblast až po blízkou infračervenou. Tomu odpovídá široké rozpětí používaných technologií excitačních zdrojů a detektorů, ale především rozsáhlé možnosti aplikací. Další výhodou je použitelnost vláknové optiky i spojení s různými technikami mikroskopie.





Obr. 2.7: Přehled historického vývoje používané instrumentace pro RS.

## Laserové zdroje

K eliminaci fluorescence je potřeba zdroj záření v blízké infračervené oblasti, neboť záření o dlouhé vlnové délce není ve velké míře schopné vyexcitovat molekuly do vyšších elektronických stavů, ze kterých fluorescence vzniká. Nd:YAG laser na 1024 nm ale není pro RS se CCD detektorem vhodný zdroj, protože vzniklé Ramanovo spektrum bude zasahovat mimo detekční oblast křemíkových CCD detektorů. Ani Ti:sapphire laser není ideální, i když poskytuje záření na vlnové délce  $750 \div 800$  nm, ale je příliš objemný a drahý, proto je používán výhradně ve velkých laboratořích pro čistý výzkum. Případné aplikace v průmyslu a externích podmínkách jsou s tímto zdrojem nemožné.

Vhodným zdrojem pro RS v blízké infračervené oblasti ale i ve viditelném spektru je diodový laser. Ještě donedávna však měl nevýhodu v nízkém dosažitelném výkonu okolo 25 mW, což neumožňovalo kvantitativní měření, protože intenzita Ramanova signálu je úměrná s čtvrtou mocninou energie fotonů excitačního zdroje.

Ve viditelné části spektra se používají Ar<sup>+</sup> (488 a 514 nm), He-Ne (632,8 nm), He-Cd (325 nm), frekvenčně zdvojený Nd:YAG (532 nm). Pro ultrafialovou oblast se používají frekvenčně zdvojené Ar<sup>+</sup> (229, 244 a 257 nm) laserové zdroje.

## Filtry

Filtry elektromagnetického záření ve viditelné oblasti slouží především k odstranění Rayleighova rozptylu (má stejnou vlnovou délku jako excitační zdroj) z Ramanova spektra, který ruší svojí nadměrnou intenzitou.

Novinkou v oblasti filtrování světelného záření jsou elektronicky přeladitelné filtry (ETF), jejichž spektrální přenos lze ovlivňovat přiloženým napětím, akustickým signálem apod. Takový ideální přeladitelný filtr by neměl být závislý na vlastnostech okolního prostředí (teplota, vlhkost, atd.), na úhlu dopadu záření, měl by mít nekonečný spektrální rozsah, velkou aperturu, konstantní šířku okna, malé rozměry, malou spotřebu energie atd. V praxi jsou možnosti dosažení ideálních parametrů omezené a každý typ přeladitelných filtrů se vyznačuje jinými dosažitelnými parametry, což se musí vzít v úvahu při výběru vhodného filtru pro danou aplikaci,<sup>59</sup>.

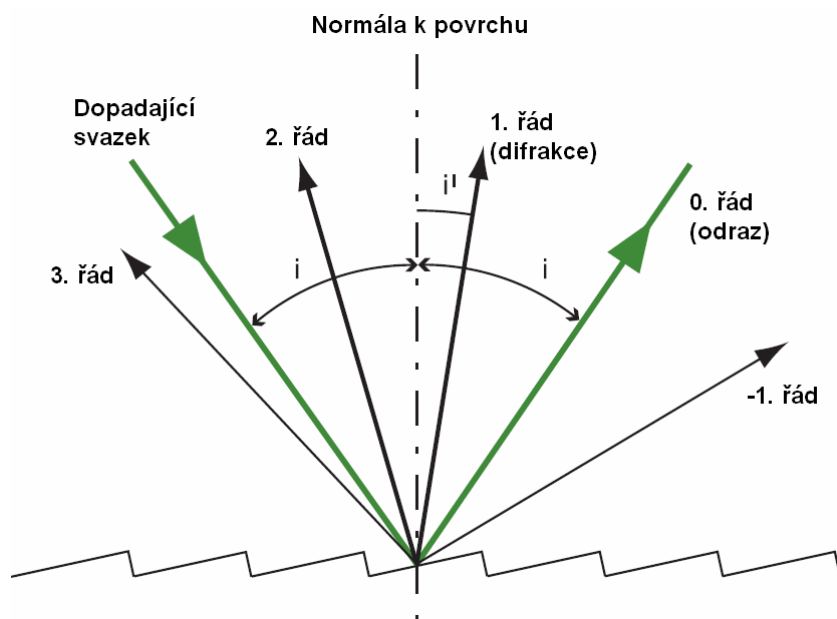
Elektronicky přeladitelné filtry jsou realizovány několika technologiemi jako např.: tekuté krystaly založené na dvojlomu, akusticko-optické zařízení založené na difrakci, interferometrické typy filtrů a další.

Pro Ramanovu spektroskopii najdou ETF využití např. jako pásmové propusti, chceme-li detekovat pouze omezenou část spektra, např. při sledování časových změn amplitudy jednoho píku v Ramanově spektru (kinetické studie konkrétní molekulární vazby).

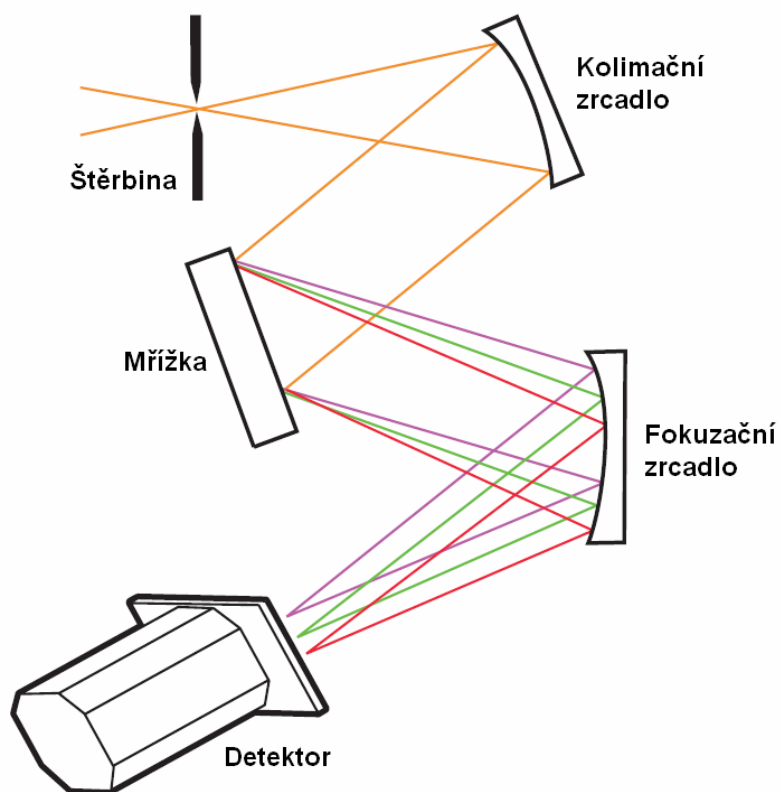
## Spektrografy

Spektrograf je zařízení k separování a měření vlnových délek elektromagnetického záření převážně ve viditelné oblasti spektra. Základní prvky spektrografu tvoří štěrbina sloužící k výběru části svazku záření, dále je to hranol nebo difrakční mřížka, které rozkládají dopadající záření na jednotlivé barvy, a optika pro vedení svazku záření od štěrbiny na rozkladný element a následně rozložené záření na vhodný detektor.

Základní typy spektrografů jsou např. Czerny-Turner (C-T) a Echelle. Většina spektrografů pro RS jsou Czerny-Turner typu. Poskytují vysoké rozlišení celého Ramanova spektra, ale jsou časově náročnější. Spektrografy Echellova typu jsou konstrukčně složitější, poskytují však vysoké rozlišení ve spektru a jsou i rychlejší,<sup>60</sup>.



**Obr. 2.8:** Schematické znázornění funkce difrakční mřížky.



**Obr. 2.9:** Schematické znázornění Czerny-Turner spektrografu.

Klíčovou komponentou C-T spektrografu je difrakční mřížka. Na obr. 2.8 je schematicky znázorněno, jakým způsobem rozkládá difrakční mřížka záření, a na obr. 2.9 je schéma Czerny-Turnerova spektrografu,<sup>61</sup>.

Z přivedení svazku na difrakční mřížku a následně na detektor lze použít zrcadla nebo čočky.

Rozlišení spektrografu je z největší míry dáno použitým typem difrakční mřížky, tj. kolik má vrypů na milimetr (l/mm). Budeme-li mít mřížku, která nám rozptýlí Ramanovo spektrum (např.  $-100\text{ cm}^{-1} \div 4000\text{ cm}^{-1}$ ) na plochu detektoru typicky 1024 pixelů, takže vezmeme, že  $4000\text{ cm}^{-1}$  bude na 1000 pixelech, budeme mít nominální rozlišení  $4\text{ cm}^{-1}$  na pixel. Teoretické rozlišení je  $8\text{ cm}^{-1}$  a z optických důvodů bude skutečné rozlišení 1,2 násobek teoretického rozlišení, což je  $10\text{ cm}^{-1}$ .

Pro lepší rozlišení budeme potřebovat difrakční mřížku s větším počtem vrypů na milimetr. Rozprostřeme-li  $1000\text{ cm}^{-1}$  na 1000 pixelů, bude teoretické rozlišení  $2\text{ cm}^{-1}$ . Získáme však s dobrým rozlišením jen část spektra. K získání zbývajících částí budeme muset difrakční mřížku pootočit a získané části spektra spojit softwarovou cestou. Otáčení mřížkou je časově náročné (i několik sekund) a z toho vyplývá mnoho nevýhod. Různé části spektra budou změřeny v různých časových okamžicích, což je nepřijatelné pro kinetické studie.

Echelleovy spektrografy mají dva difrakční elementy (dvě mřížky nebo jednu mřížku a hranol). Difrakční elementy pracují vůči sobě otočeny o  $90^\circ$ . Výsledkem je několik pod sebou umístěných částí spektra s vysokým rozlišením v jednom kroku a ve stejném čase. Tento typ spektrografů se převážně používá pro teleskopy a ICP (Inductively Coupled Plasma). Pro RS se téměř nepoužívá, protože je málo efektivní.

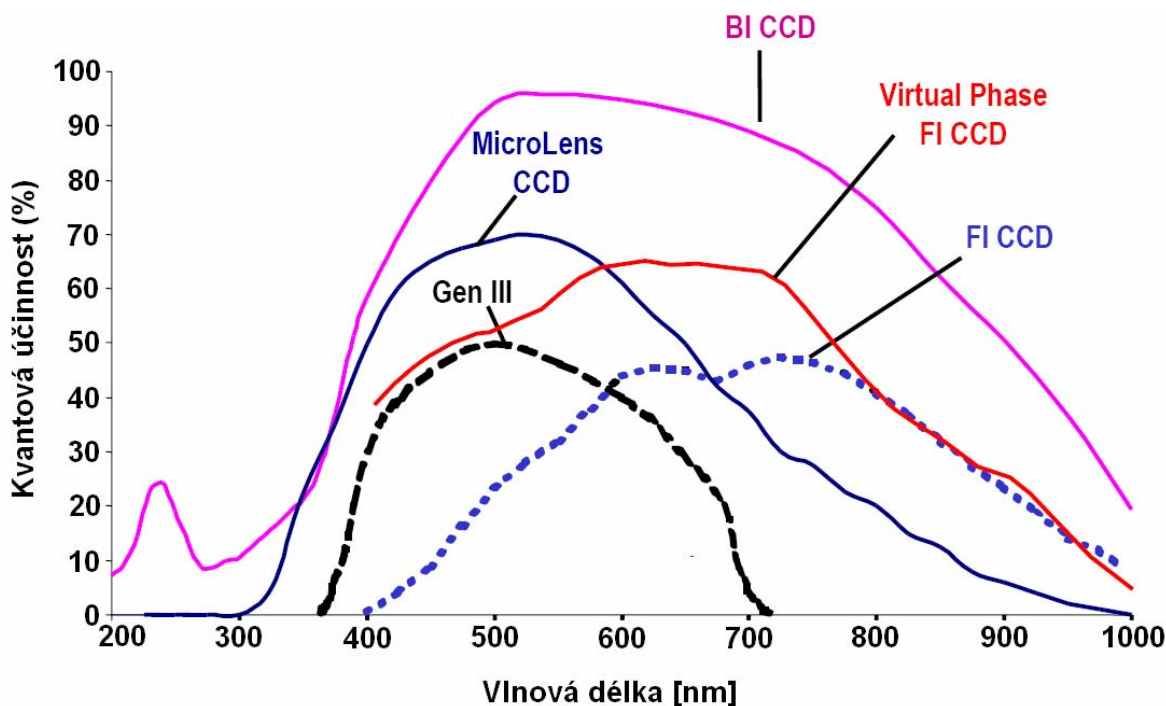
## Detektory

CCD detektory jsou pro Ramanovu spektroskopii v současné době nejpoužívanější typy detektorů. Dříve používané fotonásobiče a diode-array detektory se v moderních přístrojích neuplatňují.

Základním typem je křemíkový front-illuminated CCD (FI-CCD) detektor, který je nejlevnější. Má však nevysokou kvantovou účinnost (QE), zvláště pro modrou barvu (viz. obr. 2.10). S anti-bloomingem klesá kvantová účinnost téměř na polovinu. Tento typ detektoru se nehodí pro slabá Ramanova spektra, lze ho ale použít pro SERS vysokých koncentrací látek a orientační měření.



Detektory s anti-bloomingem také nejsou příliš vhodné, jednak pro nízkou senzitivitu a za druhé nízký fill factor (70 %) snižuje prostorovou rozlišovací schopnost. Hrozí-li při snímání blooming (nasycený pixel „přeteče“ do sousedních), je vhodnější použít sérii krátkých expozic a softwarem obrazy sečíst. Blooming bude omezený a SNR zůstane stejné jako v případě jedné dlouhé expozice,<sup>62, 63, 67</sup>.



**Obr. 2.10:** Kvantová účinnost pro různé typy CCD detektorů,<sup>62</sup>.

Laserové zdroje jako Ti:sapphire a diodové lasery umožňují Ramanovu spektroskopii v blízké infračervené oblasti. Zde však vyvstává problém s vhodným CCD detektorem, protože základní typy těchto detektorů mají malou kvantovou účinnost (QE) v oblasti 700 nm ÷ 1 μm. Konvenční křemíkové detektory mají QE asi 7 % na 1000 nm a 3 % na 1050 nm. Zlepšení kvantové účinnosti poskytují tzv. back-illuminated CCD (BI-CCD), i když jejich odezva mívá sinusovou varianci na vlnové délce. Jejich QE na 1000 nm je 19 % a na 1050 nm 6 %, <sup>64, 65, 66</sup>.

Jelikož je křemík pro záření o 1000 nm částečně transparentní a průměrná hloubka absorpce je pro tuto vlnovou délku asi 100 μm, bylo dalším vylepšením křemíkových CCD detektorů zvětšení depleční zóny z 5 μm na 20 μm. Nezbytností je také antireflexní povrch na čipu kvůli vysokému indexu lomu křemíku (3.5). Takto upravené BI-CCD detektory dosahují QE více jak 39 % pro 1000 nm a 23 % pro 1050 nm.

Pro UV oblast  $180 \div 400$  nm se používají jak dražší BI-CCD detektory s průměrnou kvantovou účinností 45 %, tak levnější front-iluminated detektory se scintilační vrstvou a kvantovou účinností okolo 15 %. Pro UV oblast do 120 nm jsou k dispozici detektory s MgF<sub>2</sub> oknem.

CARS spektroskopie vyžaduje hradlované detektory často s intenzifikací. Hradlování musí být spojeno s pulzním laserem.

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 *MODELOVÁNÍ ELEKTROMAGNETICKÉHO POLE*

Studiem chování kovových nanočástic v elektromagnetickém poli a jejich vlivu na Ramanovu spektroskopii se zabývá mnoho vědeckých skupin po celém světě a této problematice je věnováno velké množství literatury. Proto bylo od řešení této problematiky upuštěno, a místo toho se řešil problém vzniku tzv. „photonic nanojet“ na zastíněné straně dielektrických mikročástic.

V nedávné době se totiž ukázalo být perspektivní využití takovýchto mikročástic pro zesílení elektromagnetického pole dopadajícího záření, jak pro spektroskopické metody, tak zvláště pro nové metody ultramikroskopie. Spojení obojího by bylo zajímavé z hlediska měření Ramanových spekter a současně snímání obrazu měřeného objektu, např.: buňky a jejich části, virové částice i molekuly.

Jevu, který se objevuje na zastíněné straně dielektrických kulových částic, válcových částic a vlákních s průměrem v mikrometrech, se říká „photonic nanojet“. Projevuje se jako lokální zesílení intenzity elektromagnetického pole. Umístěním nanometrové dielektrické nebo kovové částice do centra „photonic nanojet“ dosáhneme dalšího zesílení, tentokrát zpětně odraženého záření a to o několik řádů,<sup>68, 69, 70, 71</sup>.

Předpokládá se využití tohoto jevu v optické mikroskopii, která je limitovaná difrakcí a tím je omezená prostorová rozlišovací schopnost. „Photonic nanojet“ může být nástrojem k překročení difrakčního limitu. Vyvíjí se nový typ ultramikroskopie nazvaný Photonic Nanojet Scanning Microscopy (PNSM), jehož základem je optické vlákno, na jehož jedné straně vzniká zmíněný jev, a toto vlákno slouží jako skenovací prvek,<sup>72</sup>.

#### 3.1.1 2D FDTD modelování

Metoda FDTD pro modelování elektromagnetického pole v okolí mikro- a nanočástic byla vybrána pro její snadnou implementaci v prostředí Matlab. Její nevýhodou je však velká náročnost na výkonnost hardwaru. Programové prostředí simulace bylo vytvořeno v softwaru Matlab Version 7.1.0.246 (R14) Service Pack 3. Počítač, na kterém

byla aplikace odladěna, měl tyto základní parametry: Intel(R) Core(TM)2 Duo CPU, 2,66 GHz, 2 GB RAM, OP Windows XP Professional.

Přestože samotný program je velmi jednoduchý, množství operací s jednotlivými buňkami velkých matic, obrovskou mírou zatěžuje virtuální paměť počítače a vyžaduje rychlý přenos dat mezi procesorem a pamětí. Z tohoto důvodu nebylo možné provádět simulaci 3D FDTD na výše zmíněném počítači. Avšak pro řešení problému šíření elektromagnetického pole v okolí částic v mikro- a nano rozměrech je řešení v 2D dostačující.

2D FDTD lze provádět ve dvou módech. Jedním je TM (Transverse Magnetic) mód, který se skládá z jedné komponenty elektrického pole  $E_z$  a dvou komponent magnetického pole  $H_x$  a  $H_y$ . Druhým je TE (Transverse Electric) mód složený ze dvou komponent elektrického pole  $E_x$  a  $E_y$  a jedné komponenty magnetického pole  $H_z$ .

Pro řešení šíření elektromagnetického pole v přítomnosti dielektrických částic bylo použito TM módu s těmito rovnicemi:

$$E_z(x, y) = A(x, y)E_z(x, y) + B(x, y)[H_y(x, y) - H_y(x-1, y) + H_x(x, y-1) - H_x(x, y)]$$

$$H_x(x, y) = H_x(x, y) + C(x, y)[E_z(x, y) - E_z(x, y+1)]$$

$$H_y(x, y) = H_y(x, y) + C(x, y)[E_z(x+1, y) - E_z(x, y)]$$

$$A(x, y) = \frac{2\varepsilon(x, y) - \Delta t \sigma(x, y)}{2\varepsilon(x, y) + \Delta t \sigma(x, y)}$$

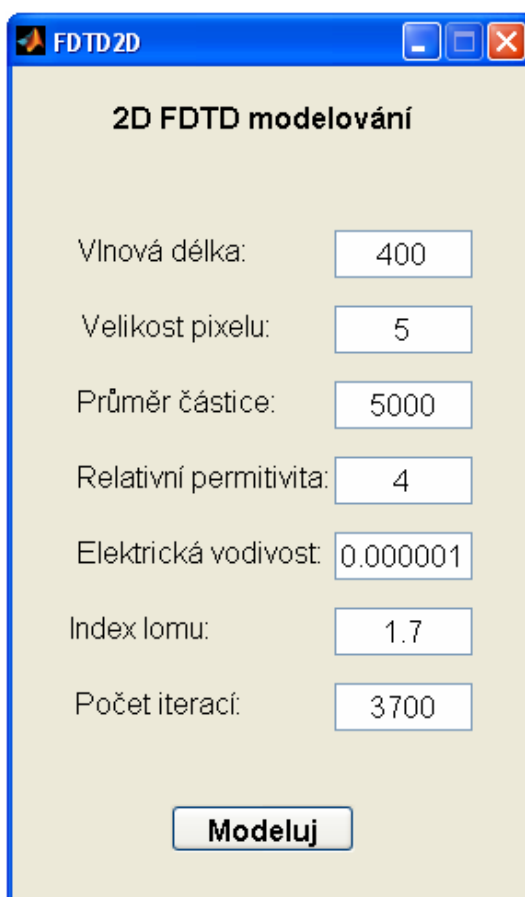
$$B(x, y) = \frac{2\Delta t}{(2\varepsilon(x, y) - \Delta t \sigma(x, y))\delta}$$

$$C(x, y) = \frac{\Delta t}{\mu(x, y)\delta}$$

K vytvoření aplikace bylo použito také modulu GUI (Graphical User Interface). Pomocí tohoto prostředí může uživatel aplikace určovat hodnoty některých parametrů. Na obr. 3.1 je znázorněn panel FDTD2D.

Na uživatelském panelu byly přednastaveny hodnoty vlnové délky zdroje záření, velikosti pixelu 2D prostoru v nanometrech, průměr modelované částice v nanometrech, relativní permitivita a elektrická vodivost materiálu částice, index lomu částice a počet iterací.

Stiskem tlačítka „Modeluj“ se spouští samotný algoritmus 2D FDTD, který se skládá z několika částí.



Obr. 3.1: Uživatelský panel.

Na začátku jsou z uživatelského panelu přečteny zadané parametry:

```
lam = str2double(get(handles.elamda, 'String')); %vlnova delka zdroje  
zarení  
d = str2double(get(handles.epixel, 'String')); %velikost pixelu v  
nanometrech
```

```

D = str2double(get(handles.eprumer, 'String'));      %prumer nanocastice v
nanometrech
epsR = str2double(get(handles.eperm, 'String'));      %relativni
permitivita castice
sigR = str2double(get(handles.esig, 'String'));      %elektricka vodivost
castice
ri = str2double(get(handles.elom, 'String'));      %index lomu cstice
iter = str2double(get(handles.eiter, 'String'));      %pocet iteracnich
kroku

```

V dalším kroku jsou definovány konstanty a inicializovány proměnné:

```

%-----definovani konstant-----
c0 = 2.99792458e8;      %rychlost svetla ve vakuu
f = c0/lam;      %frekvence zdroje zarení
mu0 = 4.0*pi*1.0e-7;      %permeabilita vakua 1.256637061e-6
eps0 = 1.0/(mu0*c0^2);      %permitivita vakua 8.854187818e-12
Nx = 1500;      %pocet pixelu v ose x
Ny = 1500;      %pocet pixelu v ose y
dt = d/(sqrt(2)*c0);      %casovy krok
T = d/c0;      %cas za který vlna urazi vzdalenost d
E0 = 10;      %maximalni intenzita zarení
R = (D/2)/d;      %polomer castice v poctu pixelu
muR = (ri^2)/epsR;      %relativni permeabilita castice

%-----inicializace promennych-----
Ez = zeros(Ny,Nx);      %el. pole v ose z
Hx = zeros(Ny,Nx);      %mag. pole v ose x
Hy = zeros(Ny,Nx);      %mag. pole v ose y
SHx = zeros(Ny,1);      %minule hodnoty pro okrajovou podminku
SHy = zeros(1,Ny);      %minule hodnoty pro okrajovou podminku
A = zeros(Ny,Nx);      %koeficient pro vypocet Ez
B = zeros(Ny,Nx);      %koeficient pro vypocet Ez
C = zeros(Ny,Nx);      %koeficient pro vypocet Hx a Hy
source = zeros(Ny,1);      %zdroj zarení
maxE = zeros(Ny,Nx);      %maximalni hodnoty el. pole

```

Následuje definování prostorové distribuce koeficientů pro výpočet elektrické a magnetických složek pole:

```

%-----prostorova distribuce parametru-----
for y=1:Ny

```

```

for x=1:Nx
    if ((y-Ny/2)^2)+((x-700)^2)<=(R^2)      %kulova castice
        eps = eps0*epsR;
        sig = sigR;
        mu = mu0*muR;
        A(y,x) = (2*eps-dt*sig)/(2*eps+dt*sig);
        B(y,x) = (2*dt)/(2*d*eps-d*dt*sig);
        C(y,x) = dt/(mu*d);
    else
        eps = eps0;
        mu = mu0;
        sig = 0;
        A(y,x) = (2*eps-dt*sig)/(2*eps+dt*sig);
        B(y,x) = (2*dt)/(2*d*eps-d*dt*sig);
        C(y,x) = dt/(mu*d);
    end
end
end;

```

Jelikož jsou v Matlabu matice indexovány způsobem řádek - sloupec, a výsledky jsou prezentovány v obrazové formě matice příkazem `imagesc`, byla řádkům přiřazena osa  $y$  a sloupcům osa  $x$ .

Posledním a nejdůležitějším blokem algoritmu je samotný časový vývoj propagace elektromagnetických vln, který je simulován iteračním výpočtem jednotlivých komponent polí s krokem  $\Delta t$ :

```

%-----vypocet elektromagnetickeho pole-----
pk = 0;

for pk=1:iter

    source(:,1) = E0*sin(2*pi*f*pk*T);      %vypocet zdroje zarení

    %-----vypocet Ez-----

    for x = 2:Nx
        for y = 2:Ny
            Ez(y,x) = A(y,x)*Ez(y,x)+B(y,x)*(Hy(y,x)-Hy(y-1,x)-Hx(y,x)+Hx(y,x-1));
        end
    end
    Ez(1,:) = Ez(2,:);

```

```

%-----pridani zdroje-----

Ez(:,1) = source(:,1);

%-----vypocet Hx-----

SHx(:,1) = Hx(:,Nx-1);      %ulozeni minulych hodnot pro okrajovou
podminku

for x = 1:Nx-1
    for y = 1:Ny
        Hx(y,x) = Hx(y,x)-C(y,x)*(Ez(y,x+1)-Ez(y,x));
    end
end

Hx(:,Nx) = SHx(:,1);      %okrajova podminka

%-----vypocet Hy-----

for x = 1:Nx
    for y = 1:Ny-1
        Hy(y,x) = Hy(y,x)+C(y,x)*(Ez(y+1,x)-Ez(y,x));
    end
end

```

Zdrojem záření je v tomto případě sinusová plošná vlna o maximální intenzitě elektrického pole  $E_0$ .

Aby se vlny šířícího se elektromagnetického pole neodrážely od rozhraní vymezeného prostoru, byly použity okrajové podmínky takové, že prvkům polí na příslušných okrajích byly přiřazeny hodnoty vedlejšího pixelu z předcházejícího iteračního kroku. Tyto okrajové podmínky jsou pro řešený problém dostatečné.

Na závěr algoritmu je v každém iteračním kroku zobrazena aktuální podoba elektrického pole:

```

%-----vektory pro vykresleni linii castice-----

a1 = 700;
b1 = Ny/2;
r1 = 3*R/4;

```



```

X1 = [a1 a1+r1 a1+R a1+r1 a1 a1-r1 a1-R a1-r1; a1+r1 a1+R a1+r1 a1
a1-r1 a1-R a1-r1 a1];
Y1 = [b1-R b1-r1 b1 b1+r1 b1+R b1+r1 b1 b1-r1; b1-r1 b1 b1+r1 b1+R
b1+r1 b1 b1-r1 b1-R];

```

```

%-----vykresleni el. pole-----

```

```

figure(1);
imagesc(Ez);
line(X1,Y1,'Color','b');
xlabel(pk);
colorbar;
colormap(jet);

```

Také se však do speciální matice uloží maximální absolutní hodnoty elektrického pole a po skončení iterací se tato matice zobrazí:

```

%-----maximalni hodnoty el. pole-----

```

```

for x=1:Nx
    for y = 1:Ny
        if maxE(y,x)<abs(Ez(y,x))
            maxE(y,x) = abs(Ez(y,x));
        end
    end
end
end
end      %konec iterace

```

```

%-----vykresleni maximalnich hodnot el. pole-----

```

```

figure(2);
imagesc(maxE);
colorbar;
colormap(jet);
%----konec programu-----

```

### 3.1.2 Modelování dielektrických mikročástic

Modelování bylo zaměřeno na sledování vlivu velikosti částice a jejího indexu lomu na vznik „photonic nanojet“. Hodnotilo se maximální zesílení intenzity elektrického pole a vzdálenost tohoto zesílení od povrchu částice.

Byly modelovány čtyři velikosti dielektrických mikročástic v rozměrech 3  $\mu\text{m}$ , 4  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$  a 6  $\mu\text{m}$ , s indexy lomu 1,5, 1,6, 1,7 a 1,8. Také se sledoval vliv vlnové délky zdroje záření v hodnotách 400 nm, 500 nm a 600 nm.

V Příloze 2 jsou všechny výsledné obrázky modelování. Zobrazená veličina je maximální absolutní hodnota intenzity elektrického pole dosažená v průběhu celé iterace. Na následujících grafech jsou zobrazeny výsledky modelování. V tabulce Tab. 1 jsou pak hodnoty maximálního zesílení intenzity elektrického pole za částicí a vzdálenost tohoto zesílení od povrchu částice.

V legendě grafů je zvolená vlnová délka a velikost částice kódována následujícím způsobem:

Příklad: L500D5  $\rightarrow$  L500  $\Rightarrow \lambda = 500 \text{ nm}$  ... vlnová délka zdroje

D5  $\Rightarrow D = 5 \mu\text{m}$  ... průměr částice.

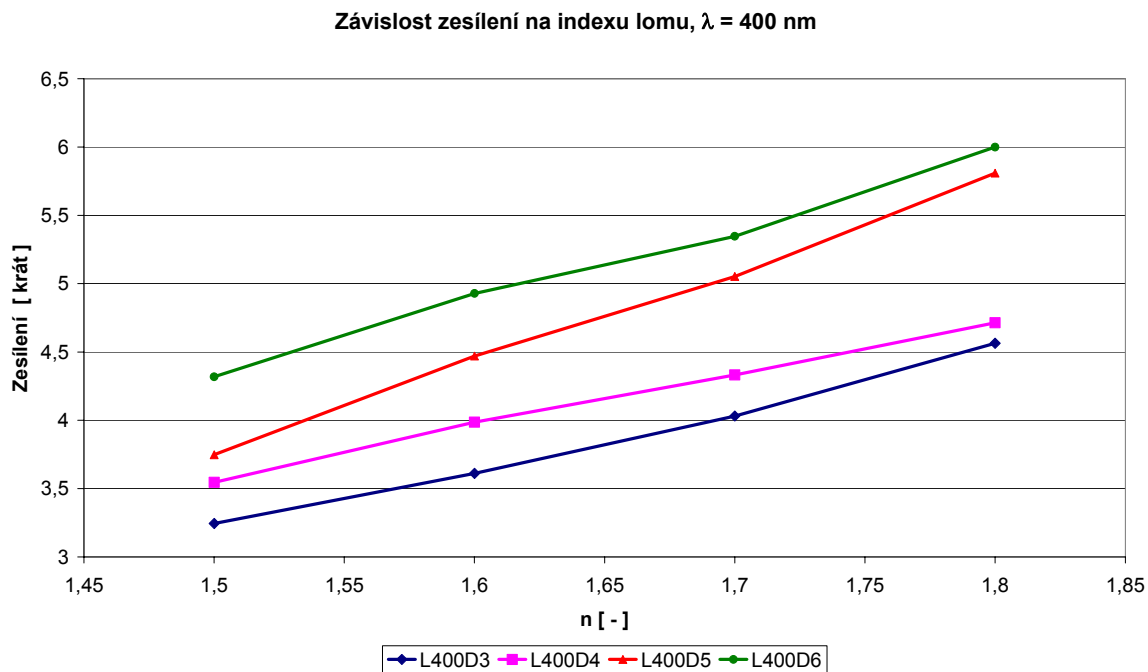
Podobné kódování je použito v pravém horním rohu obrázků v Příloze 2.

Příklad: L500D5N17  $\rightarrow$  L500  $\Rightarrow \lambda = 500 \text{ nm}$  ... vlnová délka zdroje

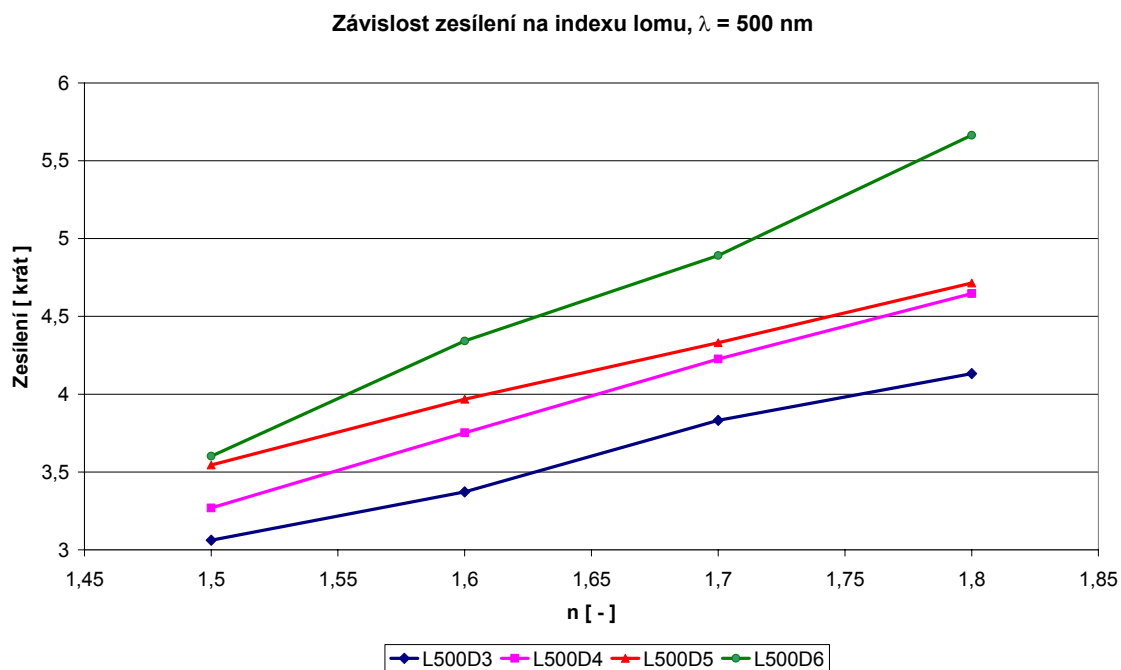
D5  $\Rightarrow D = 5 \mu\text{m}$  ... průměr částice

N17  $\Rightarrow n = 1,7$  ... index lomu částice.

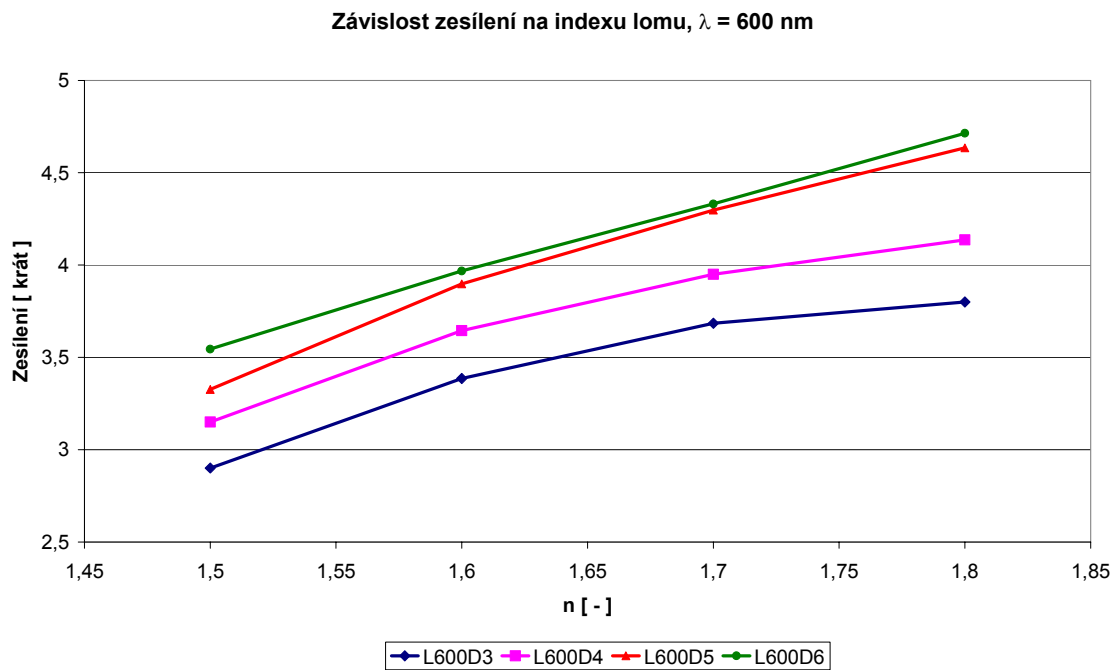
Pro index lomu 1,5 jsou výsledky mírně zkresleny, neboť nebylo možné iterovat víc jak 2700krát z důvodu vzniku nestability na okraji částice. Počet kroků byl však dostatečný k vzniku „photonic nanojet“, zkreslení se projeví pouze jeho zkrácením. Maxim a jeho poloha by zkresleny být neměly.



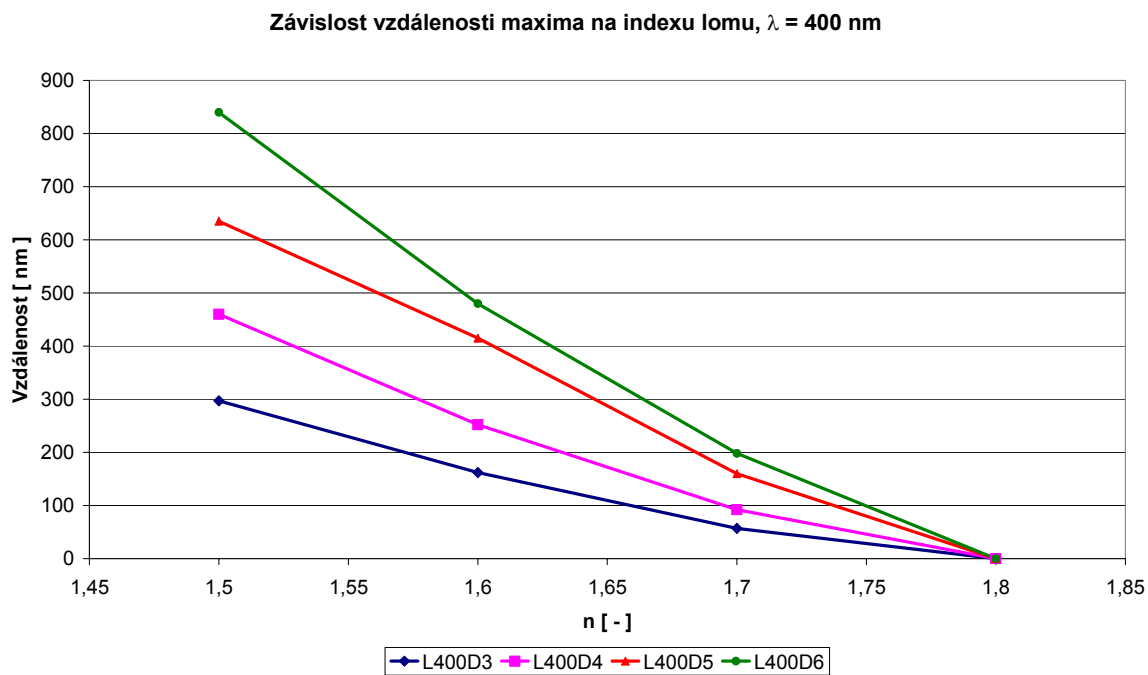
**Obr. 3.2:** Závislost zesílení intenzity elektrického pole za částicí na indexu lomu při vlnové délce 400 nm.



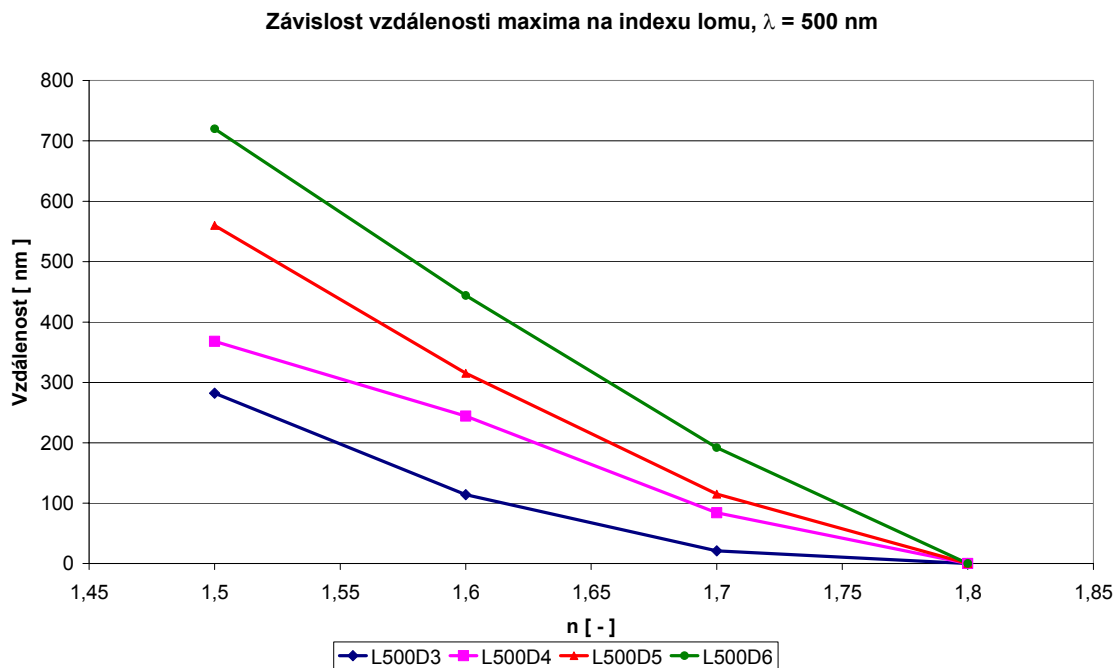
**Obr. 3.3:** Závislost zesílení intenzity elektrického pole za částicí na indexu lomu při vlnové délce 500 nm.



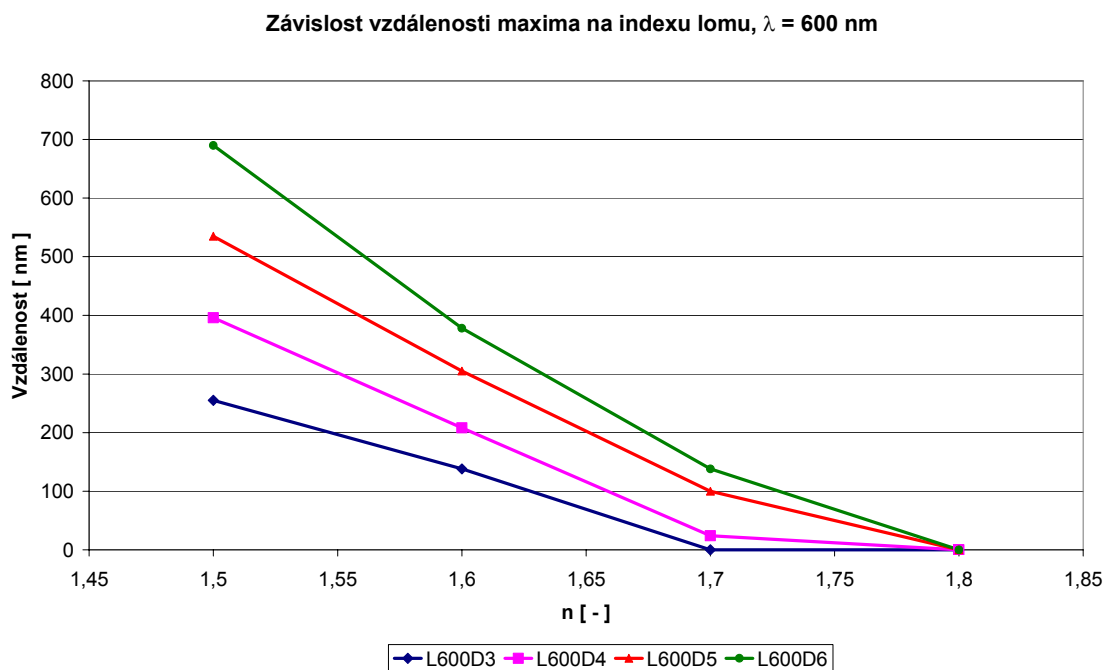
**3.4:** Závislost zesílení intenzity elektrického pole za částicí na indexu lomu při vlnové délce 600 nm.



**Obr. 3.5:** Závislost vzdálenosti maxima zesílení intenzity elektrického pole od povrchu částice na indexu lomu při vlnové délce 400 nm.



**Obr. 3.6:** Závislost vzdálenosti maxima zesílení intenzity elektrického pole od povrchu částice na indexu lomu při vlnové délce 500 nm.



**Obr. 3.7:** Závislost vzdálenosti maxima zesílení intenzity elektrického pole od povrchu částice na indexu lomu při vlnové délce 600 nm.

**Tab. 1:** Hodnoty maximálního zesílení intenzity elektrického pole za mikročásticí a vzdálenost tohoto zesílení od povrchu mikročástice, kde  $D$  je průměr mikročástice,  $n$  je index lomu,  $\lambda$  je vlnová délka a  $L$  je vzdálenost.

$D = 3 \mu\text{m}$	$\lambda = 400 \text{ nm}$		$\lambda = 500 \text{ nm}$		$\lambda = 600 \text{ nm}$	
$n [-]$	Zesílení [ krát ]	$L [\text{nm}]$	Zesílení [ krát ]	$L [\text{nm}]$	Zesílení [ krát ]	$L [\text{nm}]$
1,5	3,244	297	3,061	282	2,901	255
1,6	3,611	162	3,372	114	3,386	138
1,7	4,031	57	3,832	21	3,685	0
1,8	4,564	0	4,132	0	3,800	0
$D = 4 \mu\text{m}$						
$n [-]$	Zesílení [ krát ]	$L [\text{nm}]$	Zesílení [ krát ]	$L [\text{nm}]$	Zesílení [ krát ]	$L [\text{nm}]$
1,5	3,545	460	3,269	368	3,150	396
1,6	3,986	252	3,752	244	3,645	208
1,7	4,331	92	4,226	84	3,950	24
1,8	4,714	0	4,647	0	4,136	0
$D = 5 \mu\text{m}$						
$n [-]$	Zesílení [ krát ]	$L [\text{nm}]$	Zesílení [ krát ]	$L [\text{nm}]$	Zesílení [ krát ]	$L [\text{nm}]$
1,5	3,748	635	3,545	560	3,327	535
1,6	4,470	415	3,968	315	3,898	305
1,7	5,053	160	4,331	115	4,298	100
1,8	5,809	0	4,714	0	4,635	0
$D = 6 \mu\text{m}$						
$n [-]$	Zesílení [ krát ]	$L [\text{nm}]$	Zesílení [ krát ]	$L [\text{nm}]$	Zesílení [ krát ]	$L [\text{nm}]$
1,5	4,319	840	3,602	720	3,545	690
1,6	4,929	480	4,342	444	3,968	378
1,7	5,347	198	4,891	192	4,331	138
1,8	6,000	0	5,664	0	4,714	0

Z modelování vyplynulo, že zesílení intenzity elektrického pole za částicí stoupá se zvětšováním rozměrů částice a se zvětšováním jejího indexu lomu. Zvyšování indexu lomu však způsobuje přibližování vzdálenosti maxima zesílení k povrchu částice, od určité hodnoty je maximální zesílení na povrchu částice. Další zvyšování indexu lomu by vedlo k fokusaci záření uvnitř částice. K většímu zesílení intenzity elektrického pole vede také zkracování vlnové délky záření, současně dochází k zvětšování vzdálenosti maxima od částice.

## 3.2 MĚŘENÍ RAMANOVÝCH SPEKTER

### 3.2.1 Měřicí pracoviště

Měřicí sestava (viz. Obr. 3.8) byla umístěna na optickém stole, na který se pomocí zrcadla přiváděl svazek laserového záření. Svazek byl přiveden zespodu a byl přes čočku veden na kapiláru, která byla umístěna v držáku. Odražené a rozptýlené záření z 90° bylo přes objektiv vedeno na štěrbinu spektrografu Czerny-Turnerova typu. Na spektrograf navazovala intenzifikovaná CCD kamera.

Zdrojem excitačního záření byl argonový laser zářící na vlnové délce 488 nm s maximálním výkonem 200 mW. Objektiv byl ORIEL 40x 0,65 a přiváděl záření na štěrbinu spektrografu o šířce 50  $\mu\text{m}$  a výšce 3 mm. Před štěrbinou byl umístěn notch filtr pro odstranění složky spektra o 488 nm pocházející z excitačního zdroje, tj, Rayleighův rozptyl.

Spektrograf byl MS 125<sup>TM</sup> 1/8m model 77400 od firmy ORIEL s detektorem InstaSpec<sup>TM</sup> V Gated Intensified CCD od stejné firmy. Použitý typ spektrografu měl difrakční mřížku ruled 600 l/mm, spektrální rozsah 250 ÷ 1300 nm s rozlišením 0,7 nm.

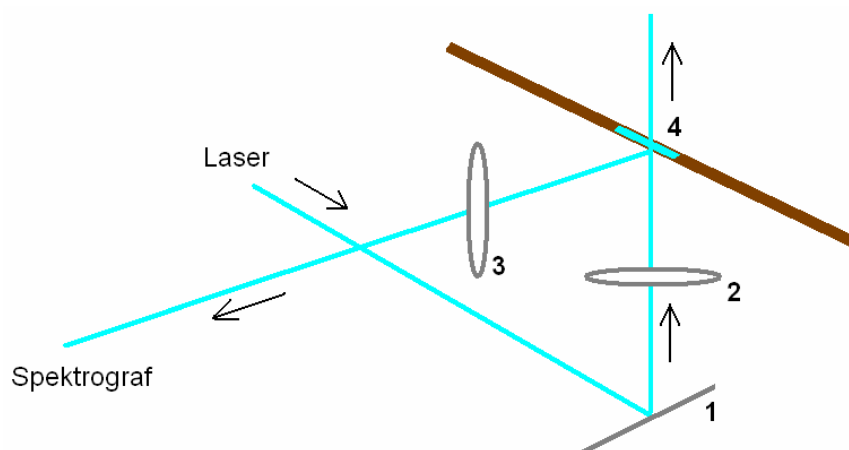
CCD chip měl rozměry 1024 x 128 pixelů o ploše 26  $\mu\text{m}^2$ . FWHM prostorového rozlišení bylo 30,94  $\mu\text{m}$ . Kamera byla vybavena zesilovačem jasu, jehož 5 až 10 ns gating vytvářel optickou clonu. Na chip bylo světlo přiváděno ze zesilovače optickými vlákny. Fosfor v zesilovači měl emisní maximum na 545 nm, čas dosvitu na 10 % 2 ms.

Detektor byl chlazen v prvním okruhu vodou nebo etanolem o teplotě 10°C, v druhém okruhu byl chlazen termoelektricky na teplotu až o 25°C nižší než bylo v prvním okruhu. Chladicí médium bylo na detektor přiváděno z externího termostatu pomocí silikonových hadiček. Termostat byl Huber CC505.

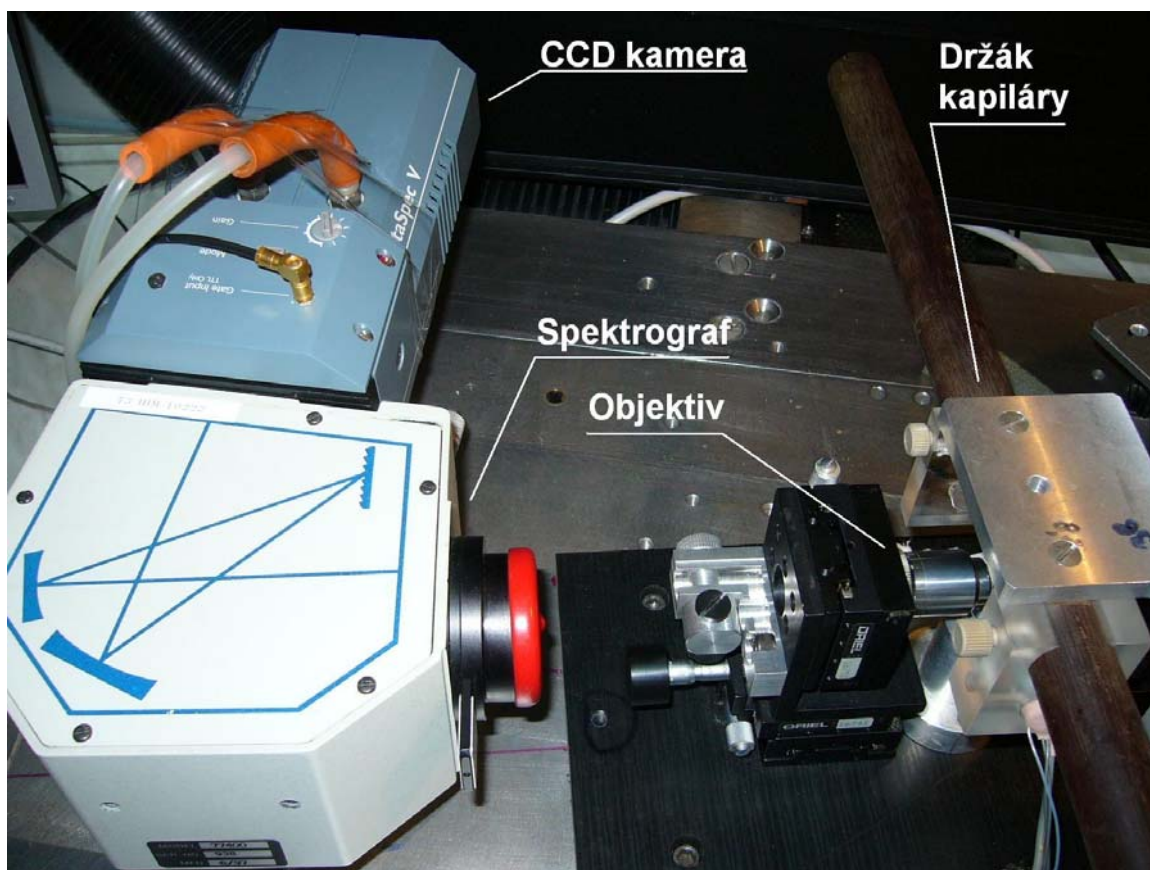
Na obr. 3.9 je vyfotografováno měřicí pracoviště.

Spektrograf bylo nutné zkalibrovat minimálně dvěma zdroji záření. Ke kalibraci byl použit Ar<sup>+</sup> laser na 488 nm a Nd:YAG double na 532 nm.

V následujícím měření s destilovanou vodou v kapiláře se ukázalo, že použitý zdroj záření Ar<sup>+</sup> laser obsahuje další složky spektra viz. obr. 3.10. Bohužel nebyl k dispozici filtr, který by tyto rušivé složky odstranil.

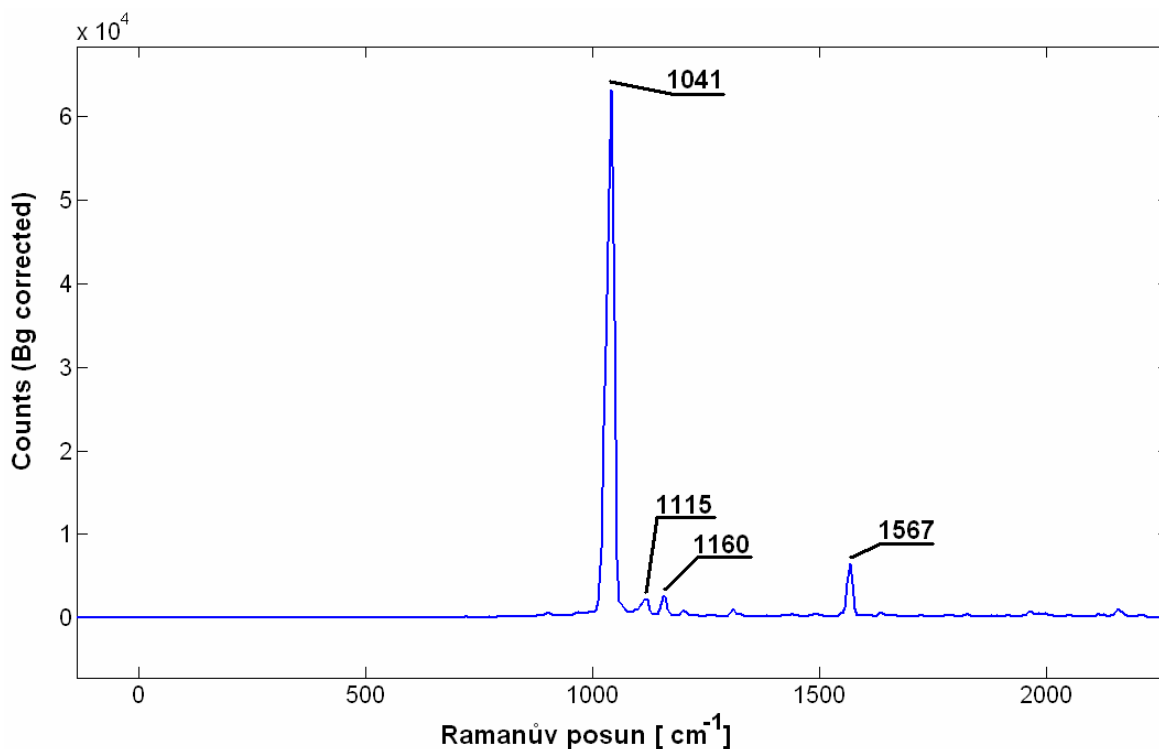


**Obr. 3.8:** Schéma dráhy laserového paprsku.  
1 – zrcadlo, 2 – čočka, 3 – objektiv, 4 – okénko kapiláry.



**Obr. 3.9:** Fotografie měřícího pracoviště; laser je umístěn vzadu pod kovovým stolem, kapilára je vedena podél držáku skrze plastové úchyty.

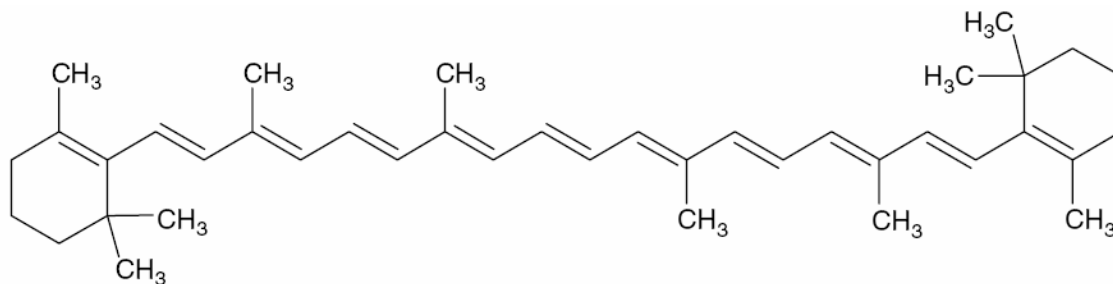




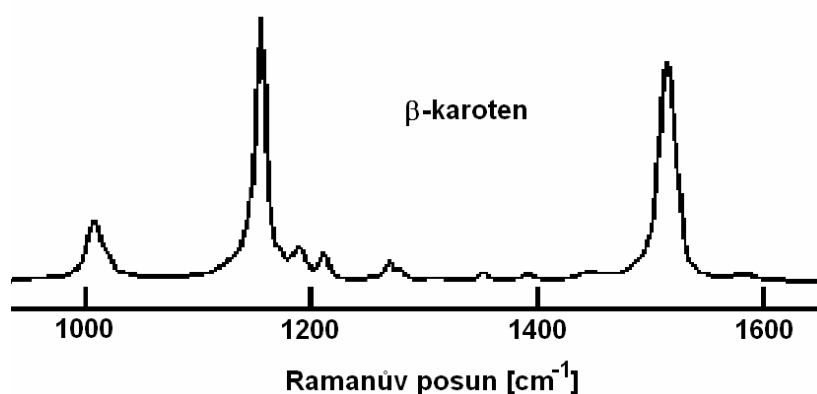
**Obr. 3.10:** Rušivé píky v Ramanově spektru.

### 3.2.2 Ramanova spektra

K měření Ramanových spekter byl vybrán  $\beta$ -karoten, neboť tato látka vykazuje při excitaci zářením o 488 nm rezonanci a v jejím spektru jsou tři výrazné píky. Na obr. 3.11 je znázorněna chemická struktura  $\beta$ -karotenu. Na obr. 3.12 je Ramanovo spektrum  $\beta$ -karotenu při excitaci laserem o 785 nm,<sup>73</sup>.



**Obr. 3.11:** Struktura  $\beta$ -karotenu.

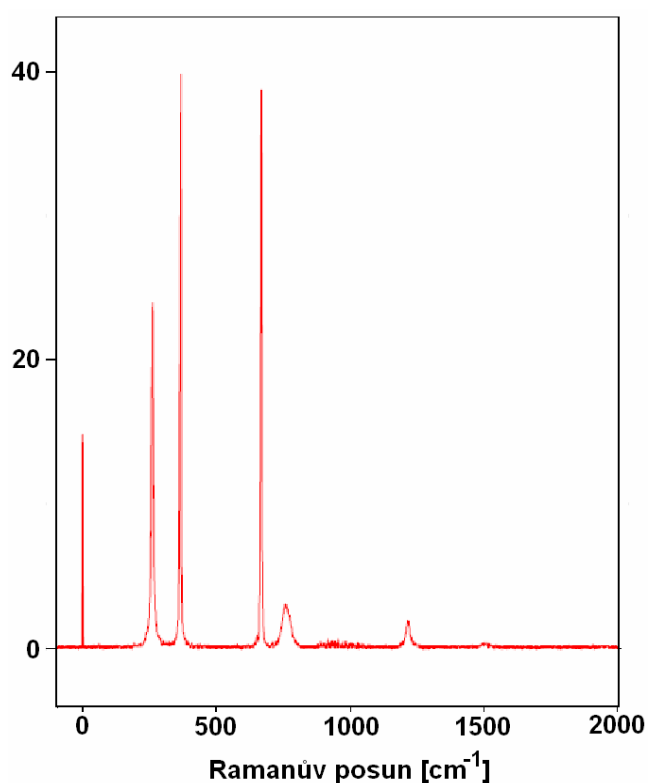


**Obr. 3.12:** Ramanovo spektrum  $\beta$ -karotenu pro laser o 785 nm.

$\beta$ -karoten má pro excitaci 785 nm tyto píky: 1008 (st), 1156 (vs), 1190 (st), 1211 (st), 1270 (sl), 1280 (sl), 1353 (sl), 1394 (sl), 1448 (sl), 1515 (vs). (sl – slabý, st – střední, vs – velmi silný.)

V rezonančním Ramanově spektru (excitace 488 nm) jsou nejvýraznější píky 1008  $\text{cm}^{-1}$  (vazba C-CH<sub>3</sub>), 1159  $\text{cm}^{-1}$  (vazba C-C) a 1525  $\text{cm}^{-1}$  (vazba C=C),<sup>74</sup>.

Na obr. 3.13 je Ramanovo spektrum chloroformu,<sup>75</sup> který byl použit jako rozpouštědlo pro  $\beta$ -karoten.



**Obr. 3.13:** Ramanovo spektrum chloroformu.

## Příprava vzorků

Práškový  $\beta$ -karoten (BioChemika, purum  $\geq 97,0$  %,  $M = 536,9$  g/mol) byl rozpuštěn v chloroformu (Lach-Ner,  $M = 119,38$  g/mol) v koncentracích  $10^{-2}$  M,  $5 \cdot 10^{-3}$  M,  $5 \cdot 10^{-4}$  M,  $5 \cdot 10^{-5}$  M a  $5 \cdot 10^{-6}$  M.

Stříbrné nanočástice byly připraveny podle metody Lee a Meisela,<sup>76</sup>.  $\text{AgNO}_3$  byl rozpuštěn ve vodě na koncentraci 0,25 mM a roztok byl přiveden k varu. Do 250 ml tohoto roztoku bylo v následujících 10 minutách po kapkách přidáno 5 ml 1 % roztoku citronanu sodného. Výsledný roztok byl udržován ve varu dalších 50 minut. Během celého procesu byl roztok míchán. Hotové nanočástice byly skladovány v ledničce.

Pro měření SERS spekter byly nanočástice dále připraveny takto: 1ml zásobního roztoku stříbrných nanočástic byl centrifugován zhruba 1 min při 14000 ot/min. Ze dna bylo odebráno 20  $\mu\text{l}$  částic a rozmícháno v 1 ml etanolu. Do tohoto roztoku byly přidány 4  $\mu\text{l}$  nasyceného roztoku NaCl. **Pozn.:** po přidání solného roztoku dochází k vytvoření klastrů nanočástic, které však mají schopnost zesilovat SERS signál pouze několik minut (asi 5 minut) po smíchání s roztokem  $\beta$ -karotenu.

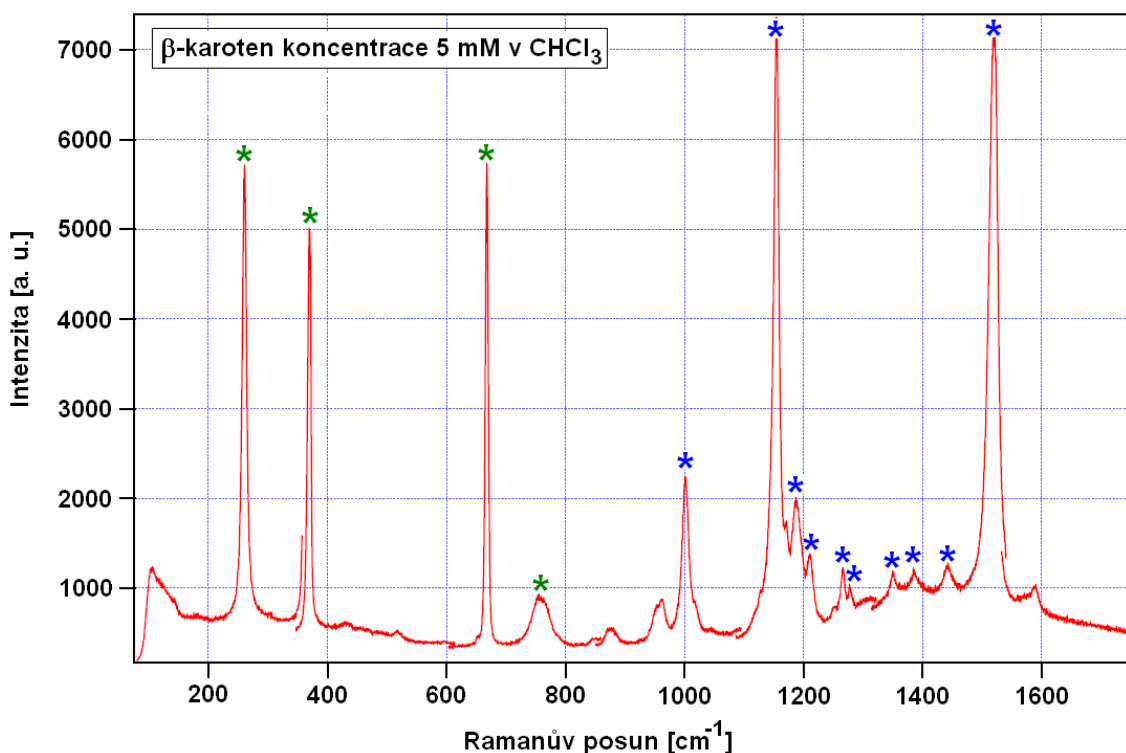
Do 20  $\mu\text{l}$  roztoku nanočástic aktivovaného NaCl se přidalo 20  $\mu\text{l}$  roztoku  $\beta$ -karotenu. Konečné roztoky  $\beta$ -karotenu měly tyto koncentrace:  $2,5 \cdot 10^{-3}$  M,  $2,5 \cdot 10^{-4}$  M,  $2,5 \cdot 10^{-5}$  M a  $2,5 \cdot 10^{-6}$  M.

## Klasické Ramanovo spektrum

Klasické Ramanovo spektrum nebylo na výše popsané měřicí soustavě (kapitola 3.2.1) změřeno, i když byla koncentrace vzorku  $\beta$ -karotenu  $10^{-2}$  M. V důsledku rušivých píků z laserového zdroje (viz. obr. 3.10) nemohla být prodloužena akviziční doba, ani použit vysoký gain intenzifikátoru CCD kamery.

Klasické Ramanovo spektrum  $\beta$ -karotenu bylo změřeno na jiné měřicí soustavě na Ústavu přístrojové techniky AV ČR. Excitační laser byl Ti:safír na vlnové délce 785 nm, která nezpůsobuje rezonanci vibračních stavů molekuly  $\beta$ -karotenu. Výkon laseru byl 100 mW. Změřené spektrum je na obr. 3.14. Byla použita koncentrace  $\beta$ -karotenu 5 mM v chloroformu.

V obrázku jsou zelenými hvězdičkami označeny píky chloroformu a modrými hvězdičkami píky  $\beta$ -karotenu. Spektrum bylo složeno z několika dílčích částí, neboť měření probíhalo s vysokým rozlišením na úzkém pásmu vlnových délek.



**Obr. 3.14:** Klasické Ramanovo spektrum  $\beta$ -karotenu v chloroformu v koncentraci 5 mM, zelenými hvězdičkami jsou označeny píky chloroformu, modrými  $\beta$ -karotenu.

V naměřeném spektru jsou viditelné všechny píky  $\beta$ -karotenu zmíněné výše (1008, 1156, 1190, 1211, 1270, 1280, 1353, 1394, 1448 a 1515  $\text{cm}^{-1}$ ). Stejně tak i píky chloroformu odpovídají literatuře,<sup>75</sup>.

### SERS v suspenzi nanočástic

Vzorky  $\beta$ -karotenu se stříbrnými nanočásticemi připravené dle návodu uvedeného výše byly změřeny s těmito akvizičními parametry pomocí softwaru InstaSpec V by ORIEL:

Typ akvizice – Counts (Bg corrected)

Readout Mode – Full Vertical Binning

Akviziční doba – 2 s

Akumulace – 10x

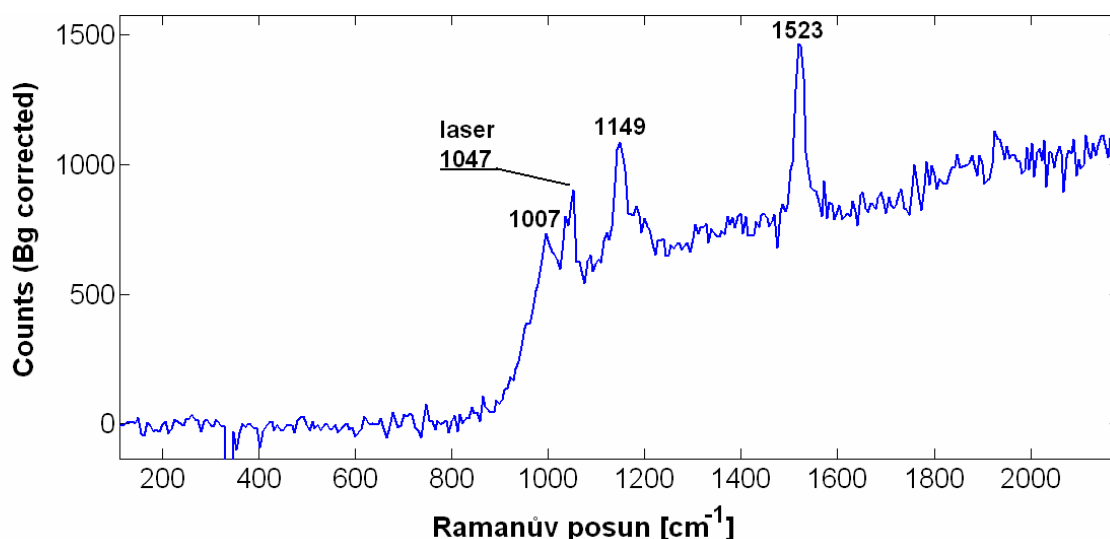
Gain intenzifikátoru – 0

Intensifier Gate Width – 80 ns

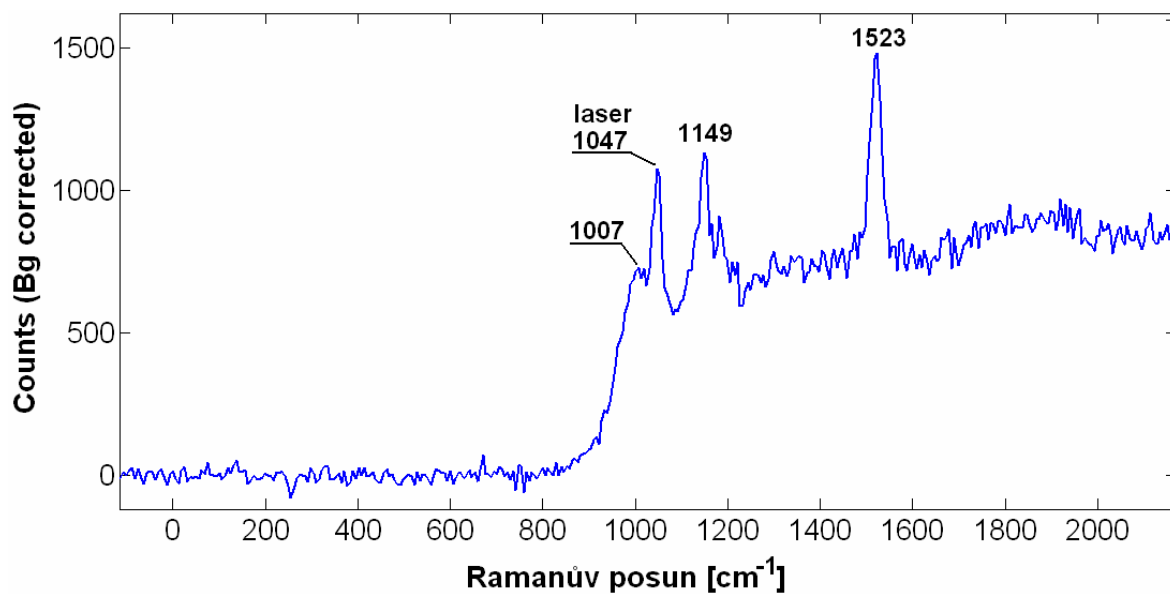
Před každým měřením spektra se provedlo měření pozadí s uzavřenou štěrbinou spektrografu. Po sejmutí spektra vzorku, bylo od tohoto spektra odečteno pozadí (tomu odpovídá typ akvizice – Bg corrected).

Na následujících obrázcích jsou výsledky měření. Z obrázků je patrné, že tři nejsilnější píky  $\beta$ -karotenu (1007, 1149 a 1523  $\text{cm}^{-1}$ ) překrývá fluorescence vzorku. Ramanův posun píků je mírně odlišný od hodnot udaných v literatuře,<sup>73, 74</sup>, ale odchylka v několika jednotkách  $\text{cm}^{-1}$  je přijatelná.

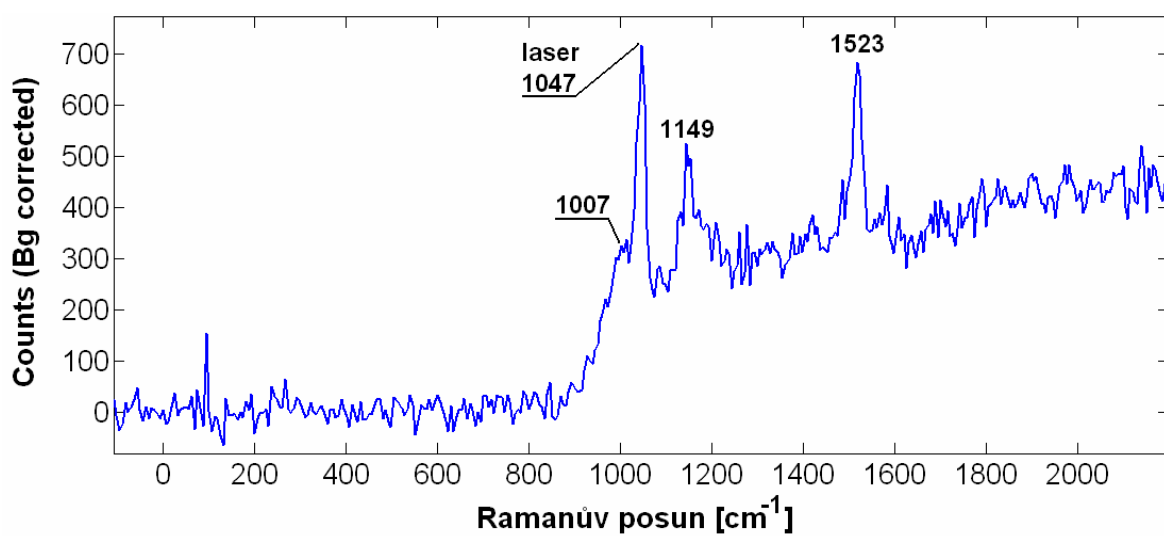
Spektrum poslední koncentrace  $\beta$ -karotenu  $2,5 \cdot 10^{-6}$  M nebylo s udanými akvizičními parametry odlišitelné od šumu a nasuperponované fluorescence. Zřetelnějšího spektra bylo dosaženo až s použitím gainu intenzifikátoru 2, ostatní akviziční parametry zůstaly beze změny.



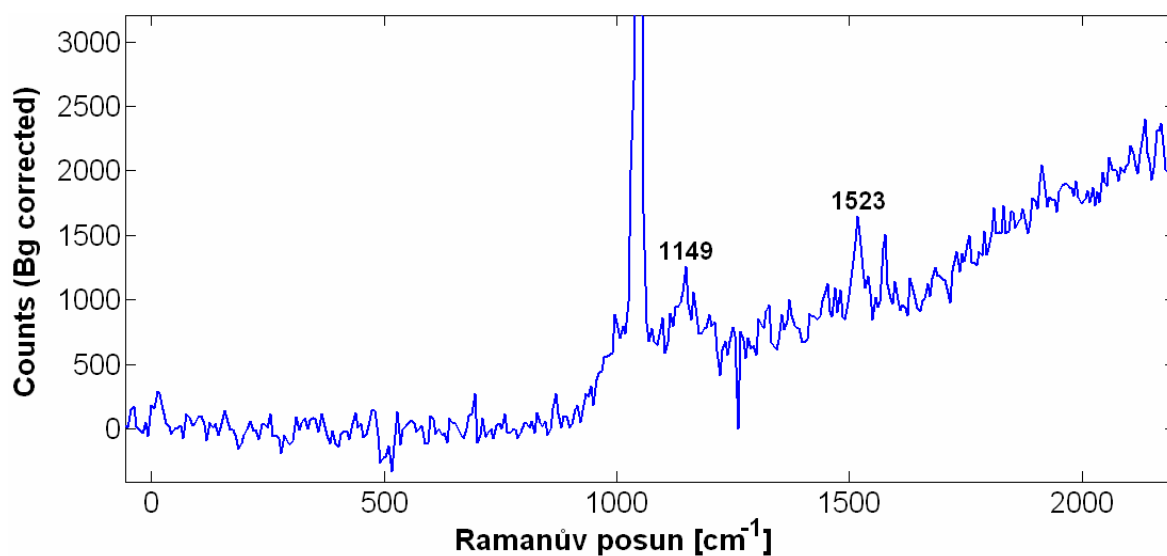
**Obr. 3.15:** SERS spektrum  $\beta$ -karotenu + Ag nanočástice v koncentraci  $2,5 \cdot 10^{-3}$  M, akvizice 2 s, akumulace 10 x, gain 0.



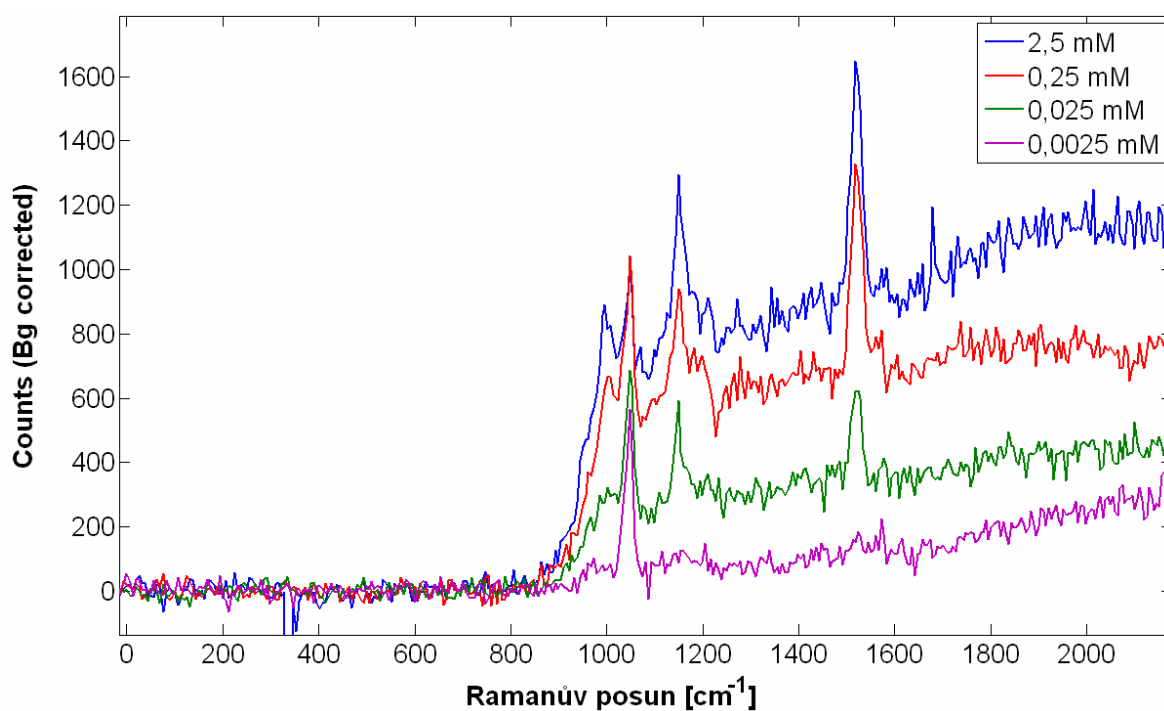
**Obr. 3.16:** SERS spektrum  $\beta$ -karotenu + Ag nanočástice v koncentraci  $2,5 \cdot 10^{-4}$  M, akvizice 2 s, akumulace 10 x, gain 0.



**Obr. 3.17:** SERS spektrum  $\beta$ -karotenu + Ag nanočástice v koncentraci  $2,5 \cdot 10^{-5}$  M, akvizice 2 s, akumulace 10 x, gain 0.



**Obr. 3.18:** SERS spektrum  $\beta$ -karotenu + Ag nanočástice v koncentraci  $2,5 \cdot 10^{-6}$  M, akvizice 2 s, akumulace 10 x, gain 2.



**Obr. 3.19:** Srovnání SERS spekter  $\beta$ -karotenu + Ag nanočástice v koncentracích  $2,5 \cdot 10^{-3}$  M,  $2,5 \cdot 10^{-4}$  M,  $2,5 \cdot 10^{-5}$  M,  $2,5 \cdot 10^{-6}$  M.

Každá koncentrace byla změřena třikrát. Pro každé měření byla určena směrodatná odchylka a odhadnuta úroveň fluorescence v místě píků (1007, 1149 a 1523  $\text{cm}^{-1}$ ). Pík byl vyhodnocen jako odlišitelný od šumu, pokud rozdíl intenzity píků a fluorescence byl větší než osminásobek směrodatné odchylky šumu. (Intenzitou píku považujeme počet detekovaných fotonů – Counts.) V tabulkách 2, 3 a 4 jsou výsledky této analýzy, která byla provedena pro koncentrace vzorků  $2,5 \cdot 10^{-3}$  M,  $2,5 \cdot 10^{-4}$  M a  $2,5 \cdot 10^{-5}$  M.

**Tab. 2:** Analýza odstupů píku od šumu pro pík 1007  $\text{cm}^{-1}$ ,  
kde  $\sigma(\text{šum})$  – směrodatná odchylka šumu, **Int.** – intenzita píku,  
**Fluo.** – intenzita fluorescence, **Rozdíl** – rozdíl intenzit píku  
a fluorescence, **Je větší** – rozhodnutí, je-li rozdíl intenzit větší  
než osminásobek směrodatné odchylky šumu.

Pík 1007 $\text{cm}^{-1}$						
	$\sigma(\text{šum})$	$8 \cdot \sigma(\text{šum})$	Int.	Fluo.	Rozdíl	Je větší
1) $2,5 \cdot 10^{-3}$ M	22,2	177,9	890	620	270	ano
2) $2,5 \cdot 10^{-3}$ M	24,5	196,1	827	620	207	ano
3) $2,5 \cdot 10^{-3}$ M	21,5	171,9	827	540	287	ano
1) $2,5 \cdot 10^{-4}$ M	20,4	162,9	665	460	205	ano
2) $2,5 \cdot 10^{-4}$ M	20,7	165,7	709	470	239	ano
3) $2,5 \cdot 10^{-4}$ M	21,3	170,3	729	500	229	ano
1) $2,5 \cdot 10^{-5}$ M	23,4	187,2	313	200	113	ne
2) $2,5 \cdot 10^{-5}$ M	21,4	170,9	292	200	92	ne
3) $2,5 \cdot 10^{-5}$ M	21,6	173,1	295	200	95	ne

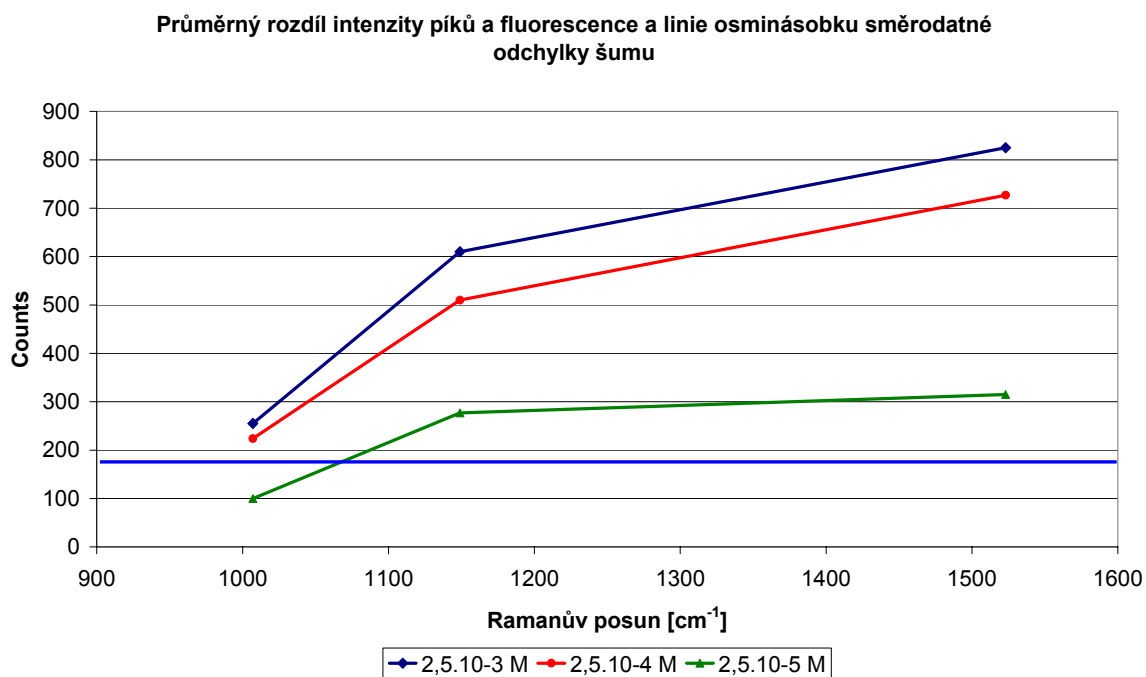
**Tab. 3:** Analýza odstupů píku od šumu pro pík 1149  $\text{cm}^{-1}$ ,  
kde  $\sigma(\text{šum})$  – směrodatná odchylka šumu, **Int.** – intenzita píku,  
**Fluo.** – intenzita fluorescence, **Rozdíl** – rozdíl intenzit píku  
a fluorescence, **Je větší** – rozhodnutí, je-li rozdíl intenzit větší  
než osminásobek směrodatné odchylky šumu.

Pík 1149 $\text{cm}^{-1}$						
	$\sigma(\text{šum})$	$8 \cdot \sigma(\text{šum})$	Int.	Fluo.	Rozdíl	Je větší
1) $2,5 \cdot 10^{-3}$ M	22,2	177,9	1333	760	573	ano
2) $2,5 \cdot 10^{-3}$ M	24,5	196,1	1294	720	574	ano
3) $2,5 \cdot 10^{-3}$ M	21,5	171,9	1294	610	684	ano
1) $2,5 \cdot 10^{-4}$ M	20,4	162,9	940	530	410	ano
2) $2,5 \cdot 10^{-4}$ M	20,7	165,7	1118	530	588	ano
3) $2,5 \cdot 10^{-4}$ M	21,3	170,3	1131	600	531	ano
1) $2,5 \cdot 10^{-5}$ M	23,4	187,2	481	260	221	ano
2) $2,5 \cdot 10^{-5}$ M	21,4	170,9	517	270	247	ano
3) $2,5 \cdot 10^{-5}$ M	21,6	173,1	592	230	362	ano



**Tab. 4:** Analýza odstupu píku od šumu pro pík  $1523\text{ cm}^{-1}$ , kde  $\sigma(\text{šum})$  – směrodatná odchylka šumu, **Int.** – intenzita píku, **Fluo.** – intenzita fluorescence, **Rozdíl** – rozdíl intenzit píku a fluorescence, **Je větší** – rozhodnutí, je-li rozdíl intenzit větší než osminásobek směrodatné odchylky šumu.

Pík $1523\text{ cm}^{-1}$						
	$\sigma(\text{šum})$	$8 \cdot \sigma(\text{šum})$	Int.	Fluo.	Rozdíl	Je větší
1) $2,5 \cdot 10^{-3}\text{ M}$	22,2	177,9	1810	940	870	ano
2) $2,5 \cdot 10^{-3}\text{ M}$	24,5	196,1	1648	890	758	ano
3) $2,5 \cdot 10^{-3}\text{ M}$	21,5	171,9	1648	800	848	ano
1) $2,5 \cdot 10^{-4}\text{ M}$	20,4	162,9	1327	660	667	ano
2) $2,5 \cdot 10^{-4}\text{ M}$	20,7	165,7	1432	670	762	ano
3) $2,5 \cdot 10^{-4}\text{ M}$	21,3	170,3	1482	730	752	ano
1) $2,5 \cdot 10^{-5}\text{ M}$	23,4	187,2	657	320	337	ano
2) $2,5 \cdot 10^{-5}\text{ M}$	21,4	170,9	683	350	333	ano
3) $2,5 \cdot 10^{-5}\text{ M}$	21,6	173,1	624	350	274	ano



**Obr. 3.20:** Průměrné rozdíly intenzity píků a fluorescence a linie průměrného osminásobku směrodatné odchylky šumu (světle modrá příčka).

## 4 ZÁVĚR

Tato diplomová práce na téma „Analýza biologicky významných látek“ měla za úkol vytvořit přehled technik a instrumentace pro Ramanovu spektroskopii. Také se měly zjistit možnosti analýzy biologicky významných látek v jedné buňce a možnosti kvalitativní analýzy jedné molekuly. Součástí práce mělo být i numerické modelování molekul adsorbovaných na nanočásticích, avšak tato problematika by byla s dostupným programovým vybavením těžko realizovatelná. Proto bylo zvoleno náhradní modelování optických vlastností dielektrických mikročástic. Závěr práce mělo tvořit měření klasických Ramanových spekter, povrchově zesílených Ramanových spekter a spektra na planárním povrchu.

Ramanova spektroskopie je analytická metoda, která poskytuje spektra vibračních stavů vazeb molekuly. Spektra jsou pro každou molekulu charakteristická a dávají jak kvalitativní tak kvantitativní informace. V současné době existuje množství různých metod využívajících Ramanův jev; často používaná a snad i nejzajímavější je „Surface-enhanced Raman Spectroscopy“. Tato metoda je založena na vzniku povrchového plazmonu na kovových nanočásticích a zesílení elektromagnetického pole v blízkosti adsorbované molekuly analytu. SERS je metoda za vhodných podmínek schopná měřit spektra i jednotlivých molekul.

Navázáním různých látek (protilátek, antigenů, apod.) na nanočástice, nejčastěji zlaté, lze docílit, že budou takovéto nanočástice specificky zachytávány v různých částech buňky. Nanočásticemi označená místa pak dávají povrchově zesílený Ramanův signál. Spojení tohoto principu s konfokální mikroskopií umožňuje měření spekter a zároveň snímání obrazu zkoumaného objektu.

První experimentální částí práce bylo modelování optických vlastností dielektrických mikročástic se zaměřením na vznik jevu „photonic nanojet“, což je lokální zesílení elektromagnetického pole. Tento jev vzniká na zastíněné straně částice a jeho vlastnosti závisí na velikosti a indexu lomu částice a na vlnové délce dopadajícího záření. Předpokládá se využití tohoto jevu v nových metodách ultramikroskopie jako prostředek k překročení difrakčního limitu. Současně je možné využití několikařádkového zesílení odraženého záření od nanočástice umístěné ve středu jevu „photonic nanojet“ pro spektroskopické metody, zvláště jako je povrchově zesílená Ramanova spektroskopie.

Jako vhodná metoda k modelování elektromagnetického pole ve viditelné oblasti spektra byla vybrána metoda „Finite Difference Time Domain“. Algoritmus metody byl vytvořen v programovém prostředí Matlab. Z modelování dielektrických mikročástic vyplynulo, že zesílení intenzity elektrického pole za částicí stoupá se zvětšováním rozměrů

částice a se zvětšováním jejího indexu lomu. Zvyšování indexu lomu však způsobuje přibližování vzdálenosti maxima zesílení k povrchu částice, od určité hodnoty je maximální zesílení na povrchu částice. Další zvyšování indexu lomu by vedlo k fokusaci záření uvnitř částice. K většímu zesílení intenzity elektrického pole vede také zkracování vlnové délky záření, současně dochází i k zvětšování vzdálenosti maxima od částice.

Druhou experimentální částí práce bylo měření Ramanových spekter některé biologicky významné látky. K měření byl vybrán  $\beta$ -karoten pro jeho jednoduché Ramanovo spektrum a výskyt rezonance při použití excitačního záření o vlnové délce 488 nm. Pro měření bylo sestaveno pracoviště s Ar<sup>+</sup> laserem na 488 nm a CCD kamerou s chlazením detektoru na -15 °C. Pracoviště bylo uspořádáno pro měření se vzorkem v křemíkové kapiláře.

Klasické Ramanovo spektrum nebylo na měřicím pracovišti změřeno, i když byla použita vysoká koncentrace  $\beta$ -karotenu. Toto spektrum bylo změřeno na jiném pracovišti s Ti:safírovým laserem o 785 nm vlnové délky.

Povrchově zesílená Ramanova spektra  $\beta$ -karotenu v suspenzi stříbrných nanočástic byla změřena pro čtyři různé koncentrace od  $2,5 \cdot 10^{-3}$  M do  $2,5 \cdot 10^{-6}$  M. Naměřená spektra odpovídala svými píky spektrům uvedeným v literatuře. Zesílená spektra na planárním povrchu měřena nebyla, protože to uspořádání pracoviště nedovolovalo.

## 5 LITERATURA

- [1] ANDERSON, Larry G. *Raman Spectroscopy* [online]. 2000 [cit. 16. 3. 2008]. Dostupné na WWW: <http://carbon.cudenver.edu/public/chemistry/classes/chem4538/raman.htm>
- [2] EFREMOV, Evtim V.; ARIESE, Freek; MANK, Arjan J. G.; GOOIJER, Cees. Strong Overtones and Combination Bands in Ultraviolet Resonance Raman Spectroscopy. *Anal. Chem.*, 2006, vol. 78, p. 3152-3157.
- [3] *Raman Scattering and Fluorescence* [online]. Jobin Yvon, 2007 [cit. 21. 4. 2008]. Dostupné na WWW: <http://www.jobinyvon.com>
- [4] MATĚJKA, Pavel. Techniques of measurement and interpretation of IR and Raman spectra (Introduction to vibrational spectroscopy) [online]. VŠCHT Praha, [cit. 15.4. 2008]. Dostupné na WWW:
- [5] *Resonance Raman Theory* [online]. [cit. 24. 1 . 2008]. Dostupné na WWW: <http://www.personal.dundee.ac.uk/~tjdines/Raman/RRTHEORY.HTM>
- [6] EFREMOV, Evtim V.; ARIESE, Freek; GOOIJER, Cees. Achievements in resonance Raman spectroscopy. Review of a technique with a distinct analytical chemistry potential. *Anal. Chim. Acta*, January 2008, vol. 606, no. 2, p. 119-34.
- [7] BERNSTEIN, Paul S.; ZHAO, Da-You; SHARIFZADEH, Mohsen; ERMAKOV, Igor V.; GELLERMANN, Werner. Resonance Raman measurement of macular carotenoids in the living human eye. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2004, vol. 430, p. 163-169.
- [8] MOSKOVITS, Martin. Surface-enhanced Raman spectroscopy: a brief retrospective. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2005, vol. 36, p. 485-496.
- [9] CAMPION, Alan; KAMBHAMPATI, Patanjali. Surface-enhanced Raman scattering. *Chemical Society Reviews*, 1998, vol. 27, p. 241-250.
- [10] TIAN, Z. Q. Surface-enhanced Raman spectroscopy: advancements and applications. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2005, vol. 36, p. 466-470.
- [11] KRUSZEWSKI, Stefan. Surface enhanced Raman scattering phenomenon. *Cryst. Res. Technol.*, 2006, vol. 41, no. 6, p. 562-569.
- [12] SACKMANN, M.; MATERNY, A. Surface enhanced Raman scattering (SERS) – a quantitative analytical tool? *Journal of Raman Spectroscopy*, 2006, vol. 37, p. 305-310.

- [13] SCHATZ, George C. Theoretical Studies of Surface Enhanced Raman Scattering. *Acc. Chem. Res.*, 1984, vol. 17, p. 370-376.
- [14] KNEIPP, Katrin; MOSKOVITS, Martin; KNEIPP, Harald; (Eds.). Surface-Enhanced Raman Scattering: Physics and Applications. Springer, 2006, ISBN-10 3-540-33566-8.
- [15] KNEIPP, Harald; KNEIPP Katrin. Surface-enhanced hyper Raman scattering in silver colloidal solutions. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2005, vol. 36, p. 551-554.
- [16] LAURENT, G.; FÉLIDJ, N.; AUBARD, J.; LÉVI, G. Surface enhanced Raman scattering arising from multipolar plasmon excitation. *The Journal of Chemical Physics*, 2005, vol. 122, p. 011102.
- [17] OTTO, Andreas. The ‘chemical’ (electronic) contribution to surface-enhanced Raman scattering. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2005, vol. 36, p. 497-509.
- [18] BAENA, Josefa R.; LENDL, Bernhard. Raman spectroscopy in chemical bioanalysis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2004, vol. 8, p. 534-539.
- [19] STUART, Douglas A.; YUEN, Jonathan M.; SHAH, Nilam; LYANDRES, Olga; YONZON, Chandra R.; GLUCKSBERG, Matthew R.; WALSH, Joseph T.; VAN DUYNE, Richard P. In Vivo Glucose Measurement by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Anal. Chem.*, 2006, vol. 78, p. 7211-7215.
- [20] DE FARIA, D. L. A.; DE SOUZA, M. A. Raman Spectra of Human Skin and Nail Excited in the Visible Region. *Journal of Raman Spectroscopy*, 1999, vol. 30, p. 169-171.
- [21] FILHO, Ivo P. Torres; TERNER, James; PITTMAN, Roland N.; SOMERA, Leonardo G.; WARD, Kevin R. Hemoglobin oxygen saturation measurements using resonance Raman intravital microscopy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, vol. 289, p. 488-495.
- [22] JAIN, Prashant K.; LEE, Kyeong Seok; EL-SAYED, Ivan H.; EL-SAYED, Mostafa A. Calculated Absorption and Scattering Properties of Gold Nanoparticles of Different Size, Shape, and Composition: Application in Biological Imaging and Biomedicine. *J. Phys. Chem. B*, 2006, vol. 110, p. 7238-7248.
- [23] ZHANG, Xunli; YIN, Huabing; COOPER, Jon M.; HASWELL, Stephen J. Characterization of cellular chemical dynamics using combined microfluidic and Raman techniques. *Anal. Bioanal. Chem.*, February 2008, vol. 390, no. 3, p. 833-840.
- [24] RAMSER, Kerstin; LOGG, Katarina; GOKSÖR, Mattias; ENGER, Jonas; KÄLL, Mikael; HANSTORP, Dag. Resonance Raman spectroscopy of optically trapped

functional erythrocytes. *Journal of Biomedical Optics*, May/June 2004, vol. 9, no. 3, p. 593-600.

- [25] FOCSAN, Alexandrina Ligia. *The Use of Surface-Enhanced Raman Scattering for the Study of Living Cells : Literature Seminar*. Shelby Hall, September 2005, 13 p.
- [26] HAKA, Abigail S.; SHAFER-PELTIER, Karen E.; FITZMAURICE, Maryann; CROWE, Joseph; DASARI, Ramachandra R.; FELD, Michael S. Diagnosis breast cancer by using Raman spectroscopy. *PNAS*, August 2005, vol. 102, no. 35, p. 12371-12376.
- [27] FRANK, Christopher J.; McCREERY, Richard L.; REDD, Douglas C. B. Raman Spectroscopy of Normal and Diseased Human Breast Tissues. *Anal. Chem.*, 1995, vol. 67, p. 777-783.
- [28] GU, Wenhua; CHOI, Hyungsoo; KIM, Kyekyoon. A Quantum Mechanical Theory for Single Molecule – Single Nanoparticle Surface Enhanced Raman Scattering. *J. Phys. Chem. A*, 2007, vol. 111, p. 8121-8125.
- [29] WANG, Zhenjia; PAN, Shanlin; KRAUSS, Todd; DU, Hui; ROTHBERG, Lewis J. The structural basis for giant enhancement enabling single-molecule Raman scattering. *PNAS*, July 2003, vol. 100, no. 15, p. 8638-8643.
- [30] KNEIPP, Katrin; KNEIPP, Harald; ITZKAN, Irving; DASARI, Ramachandra R.; FELD, Michael S. Ultrasensitive Chemical Analysis by Raman Spectroscopy. *Chem. Rev.*, 1999, vol. 99, p. 2957-2975.
- [31] TAN, R. Z.; AGARWAL, A.; BALASUBRAMANIAN, N.; KWONG, D. L.; JIANG, Y.; WIDJAJA, E.; GARLAND, M. 3D arrays of SERS substrate for ultrasensitive molecular detection. *Sensors and Actuators A*, 2007, vol. 139, p. 36-41.
- [32] JIANG, Jiang; BOSNIC, Ken; MAILLARD, Mathieu; BRUS, Louis. Single Molecule Raman Spectroscopy at the Junctions of Large Ag Nanocrystals. *J. Phys. Chem. B*, 2003, vol. 107, p. 9964-9972.
- [33] BOMBACH, Rolf. Coherent anti-Stokes Raman Scattering (CARS) [online]. [cit. 26.1. 2008]. Dostupné na WWW:
- [34] HUDSON, Bruce; HETHERINGTON, William; CRAMER, Stephen; CHABAY, Ilan; KLAUMINZER, Gary K. Resonance enhanced coherent anti-Stokes Raman scattering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, November 1976, vol. 73, no. 11, p. 3798-3802.
- [35] EVANS, Conor L.; POTMA, Eric O.; PUORIS'HAAG, Mehron; CÔTÉ, Daniel; LIN, Charles P.; XIE, X. Sunney. Chemical imaging of tissue *in vivo* with video-rate

coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *PNAS*, November 2005, vol. 102, no. 46, p. 16807-16812.

- [36] PICARDI, G.; DOMKE, K.; ZHANG, D.; REN, B.; STEIDTNER, J.; PETTINGER, B. *Tip-Enhanced Raman Spectroscopy* [online]. Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft, Berlin, 2007, [cit. 23. 1. 2008]. Dostupné na WWW: [http://w3.rz-berlin.mpg.de/pc/shg/shg\\_sers/Tip\\_enhanced\\_RS.html](http://w3.rz-berlin.mpg.de/pc/shg/shg_sers/Tip_enhanced_RS.html)
- [37] HARTSCHUM, Achim; BEVERSLUIS, Michael R.; BOUHELIER, Alexandre; NOVOTNY, Lukas. Tip-enhanced optical spectroscopy. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A*, 2004, vol. 362, p. 807-819.
- [38] ZEMAN, Ellen J.; SCHATZ, George C. An Accurate Electromagnetic Theory Study of Surface Enhancement Factors for Ag, Au, Cu, Li, Na, Al, Ga, In, Zn, and Cd. *The Journal of Physical Chemistry*, 1987, vol. 91, no. 3, p. 634-643.
- [39] ZHANG, Chao. *Improvement of the electromagnetic enhancement in Surface Enhanced Raman Spectroscopy : masters's thesis*. Albuquerque : The University of New Mexico, 2007. p. 96.
- [40] SOUZA, Glauco R.; CHRISTIANSON, Dawn R.; STAQUICINI, Fernanda I.; OZAWA, Michael G.; SNYDER, Evan Y.; SIDMAN, Richard L.; MILLER, J. Houston; ARAP, Wadih; PASQUALINI, Renata. Networks of gold nanoparticles and bacteriophage as biological sensors and cell-targeting agents. *PNAS*, January 2006, vol. 103, no. 5, p. 1215-1220.
- [41] DRACHEV, Vladimir P.; NASHINE, Vishal C.; THORESON, Mark D.; BEN-AMOTZ, Dor; DAVISSON, V. Jo; SHALAEV, Vladimir M. Adaptive Silver Films for Detection of Antibody – Antigen Binding. *Langmuir*, 2005, vol. 21, p. 8368-8373.
- [42] NAJA, Ghinwa; BOUVRETTE, Pierre; HRAPOVICH, Sabahudin; LIU, Yali; LUONG, John H. T. Detection of bacteria aided by immuno-nanoparticles. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2007, vol. 38, p. 1383-1389.
- [43] ZHANG, X.; YONZON, C. R.; YOUNG, M. A.; STUART, D. A.; VAN DUYNE, R. P. Surface-enhanced Raman spectroscopy biosensors: excitation spectroscopy for optimisation of substrates fabricated by nanosphere lithography. *IEE Proc.-Nanobiotechnol.*, December 2005, vol. 152, no. 6, p. 195-206.
- [44] GONZÁLEZ, A. L.; NOGUEZ, Cecilia. Optical properties of silver nanoparticles. *Phys. Stat. Sol. (c)*, 2007, vol. 4, no. 11, p. 4118-4126.

- [45] HAO, Encai; LI, Shuyou; BAILEY, Ryan C.; ZOU, Shengli; SCHATZ, George C.; HUPP, Joseph T. Optical Properties of Metal Nanoshells. *J. Phys. Chem. B*, 2004, vol. 108, p. 1224-1229.
- [46] SOSA, Iván O.; NOGUEZ, Cecilia; BARRERA, Rubén G. Optical Properties of Metal Nanoparticles with Arbitrary Shapes. *J. Phys. Chem. B*, 2003, vol. 107, p. 6269-6275.
- [47] JAIN, P. K.; LEE, K. S. Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape and composition: Applications in biological imaging and biomedicine. *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 110, no. 14, p. 7238-7248.
- [48] GHOSH, Sujit Kumar; PAL, Tarasankar. Interparticle Coupling Effect on the Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles: From Theory to Applications. *Chem. Rev.*, 2007, vol. 107, p. 4797-4862.
- [49] YURKIN, M. A.; HOEKSTRA, A. G. *The discrete dipole approximation: an overview and recent developments* [online]. 2006 [cit. 15. 2. 2008]. Dostupné na WWW: <http://arxiv.org/ftp/arxiv/papers/0704/0704.0038.pdf>.
- [50] BRIODE, A.; JIANG, X. C. Optical properties of Gold Nanorods: DDA Simulations Supported by Experiments. *J. Phys. Chem. B*, 2005, vol. 109, no. 27, p. 13138-13142.
- [51] SCHATZ, G. C. Electrodynamics of nonspherical noble metal nanoparticles and nanoparticle aggregates. *Journal of Molecular Structure (Theochem)*, 2001, vol. 573, p. 73-80.
- [52] GONZÁLEZ, A. L.; NOGUEZ, Cecilia; ORTIZ, G. P.; RODRÍGUEZ-GATTORNO, G. Optical Absorbance of Colloidal Suspensions of Silver Polyhedral Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B*, 2005, vol. 109, p. 17512-17517.
- [53] KUNG, F.; CHUAN, H. T. A Finite-Difference Time Domain (FDTD) Software for Simulation of Printed Circuit Board (PCB) Assembly. *Progress In Electromagnetics Research*, 2005, vol. 50, p. 299-335.
- [54] JUNTUNEN, Jaakko. *Selected developments in computational electromagnetics for radio engineering : doctor's thesis*. Helsinki University of Technology Radio Laboratory Publications, 2001, 74 p.
- [55] WILKINSON, A. J. Simulating Electromagnetic Waves using the Finite Difference Time Domain (FDTD) Method. *EEE3055F*, UCT 2007.
- [56] PAKER, Selçuk; SEVGI, Levent. FDTD Evaluation of the SAR Distribution in a Human Head Near a Mobile Cellular Phone. *ELEKTRİK*, 1998, vol. 6, no. 3, p. 227-242.



- [57] DUNN, Andy. *Light Scattering From Cells* [online]. 1998 [cit. 5.1. 2008]. Dostupné na WWW: <http://www.nmr.mgh.harvard.edu/~adunn/papers/dissertation/node30.html>
- [58] ADAR, Fran; DELHAYE, Michel; DASILVA, Edouard. *Evolution of Instrumentation for Detection of the Raman Effect as Driven by Available Technologies and by Developing Applications* [online]. Jobin Yvon, Waters Symposium, Pittcon, 2003, [cit. 3.12. 2007]. Dostupné na WWW: <http://www.jyhoriba.co.uk>.
- [59] GAT, Nuham. Imaging Spectroscopy Using Tunable Filters: A Review. *Proc. SPIE*, 2000, vol. 4056, p. 50-64.
- [60] *Avalon's Detectors Explained* [online]. [cit. 2.11. 2007]. Dostupné na WWW: [http://www.avaloninst.com/content/raman\\_information/Echelle.htm](http://www.avaloninst.com/content/raman_information/Echelle.htm)
- [61] *Spectrographs* [online]. Andor Technology. [cit. 13. 12. 2007]. Dostupné na WWW: <http://www.andor.com>
- [62] COATES, Colin. *Digital EMCCD Camera Technology – Overview* [online]. Andor Technology Ltd., [cit. 3.12. 2007]. Dostupné na WWW: <http://www.emccd.com>
- [63] OWEN, Harry; KOWALCHYK, Will K. *Advanced components raise Raman sensitivity* [online]. Laser Focus World, 1997 [cit. 7. 4. 2008]. Dostupné na WWW: [http://www.laserfocusworld.com/display\\_article/30773/12/ARCHI/none/News/Advanced-components-raise-Raman-sensitivity](http://www.laserfocusworld.com/display_article/30773/12/ARCHI/none/News/Advanced-components-raise-Raman-sensitivity)
- [64] KASTNER, Joel H. *ACIS Back-Illuminated CCDs* [online]. 1997 [cit. 2.11. 2007]. Dostupné na WWW: [http://cxc.harvard.edu/newsletters/news\\_05/node11.html](http://cxc.harvard.edu/newsletters/news_05/node11.html)
- [65] *Selecting a System for Raman Spectroscopy* [online]. Roper Scientific, 2002, [cit. 2.11.2007]. Dostupné na WWW: <http://www.roperscientific.com>
- [66] *EM-CCD technical note* [online]. Hamamatsu, Japan, 2007 [cit. 12.11. 2007]. Dostupné na WWW: <http://www.hamamatsu.com>
- [67] *CCD University* [online]. Apogee Instruments, [cit. 12. 11. 2007]. Dostupné na WWW: <http://www.ccd.com/ccdu.html>
- [68] CHEN, Zhigang; TAFLOVE, Allen; BACKMAN, Vadim. Photonic nanojet enhancement of backscattering of light by nanoparticles: a potential novel visible-light ultramicroscopy technique. *Optics Express*, 2004, vol. 12, no. 7, p. 1214-1220.
- [69] HEIFETZ, Alexander; SIMPSON, Jamesina J.; KONG, Soo-Cheol; TAFLOVE, Allen; BACKMAN, Vadim. Subdiffraction optical resolution of a gold nanosphere located within the nanojet of a Mie-resonant dielectric microsphere. *Optics Express*, 2007, vol. 15, no. 25, p. 17334-17342.

- [70] LECLER, Sylvain; HAACKE, Stefan; LECONG, Nhan; CRÉGUT, Olivier; REHSPRINGER, Jean-Luc; HIRLIMANN, Charles. Photonic jet driven non-linear optics: example of two-photon fluorescence enhancement by dielectric microspheres. *Optics Express*, 2007, vol. 15, no. 8, p. 4935-4942.
- [71] FERRAND, Patrick; WENGER, Jérôme; DEVILEZ, Alexis; PIANITA, Martina; STOUT, Brian; BONOD, Nicolas; POPOV, Evgueni; RIGNEAULT, Hervé. Direct imaging of photonic nanojets. *HAL-CCSD*, 2008.
- [72] POON, Andrew W.; LEE, Yi Ho; WONG, Wai Kuen. *Photonic Nanojet Scanning Microscopy : final year project*. Hong Kong University of Science and Technology, 2004-2005. Dostupné na WWW: <http://www.ece.ust.hk/~pdl/fyp/PA1a-04.pdf>
- [73] DE GELDER, Joke; DE GUSSEM Kris; VANDENABEELE, Peter; MOENS, Luc. Reference database of Raman spectra of biological molecules. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2007, vol. 38, p. 1133-1147.
- [74] BHOSALE, Prakash; ERMAKOV, Igor V.; ERMAKOVA, Maia R.; GELLERMANN, Werner; BERNSTEIN, Paul S. Resonance Raman Quantification of Nutritionally Important Carotenoids in Fruits, Vegetables, and Their Juices in Comparison to High-Pressure Liquid Chromatography Analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, vol. 52, p. 3281-3285.
- [75] CATLIN, Michael; HENDRA, Patrick; SNOW, Mark. *A novel transfer-gas low temperature cell for Raman Spectroscopy* [online]. The Internet Journal of Vibrational Spectroscopy, 2000, vol. 4, edition 1. Dostupné na WWW: <http://www.ijvs.com/volume4/edition1/section2.html>
- [76] LEE, P. C.; MEISEL, D. Adsorption and surface-enhanced Raman of silver and gold sols. *J. Phys. Chem.*, 1982, vol. 86, p. 3391–3395.

## Seznam použitých zkratk

AFM	–	Mikroskopie atomárních sil (Atomic Force Microscopy)
BI-CCD	–	Back-Illuminated CCD
CARS	–	Koherentní anti-Stokes Ramanova spektroskopie (Coherent anti-Stokes Raman Spectroscopy)
CSRS	–	Koherentní Stokes Ramanova spektroskopie (Coherent Stokes Raman Spectroscopy)
ETF	–	Elektricky přeladitelné filtry (Electrically Tunable Filters)
FI-CCD	–	Front-Illuminated CCD
HRS	–	Hyper Ramanova spektroskopie (Hyper Raman Spectroscopy)
PARS	–	Fotonově-akustická Ramanova spektroskopie (Photon-Acoustic Raman Spectroscopy)
QE	–	Kvantová účinnost (Quantum Efficiency)
RS	–	Ramanova spektroskopie (Raman Spectroscopy)
RRS	–	Rezonanční Ramanova spektroskopie (Resonance Raman Spectroscopy)
SERS	–	Povrchově zesílená Ramanova spektroskopie (Surface-Enhanced Raman Spectroscopy)
SERRS	–	Povrchově zesílená rezonanční Ramanova spektroskopie (Surface-Enhanced Resonance Raman Spectroscopy)
SMRS	–	Jednomolekulová Ramanova spektroskopie (Single Molecule Raman Spectroscopy)
SMSERS	–	Jednomolekulová povrchově zesílená Ramanova spektroskopie (Single Molecule Surface-Enhanced Raman Spectroscopy)
SNR	–	Poměr signál/šum (Signal to Noise Ratio)
SPR	–	Rezonance povrchového plazmonu (Surface Plasmon Resonance)
TE	–	Transverse Electric mode
TERS	–	Na hrotu zesílená Ramanova Spektroskopie (Tip-Enhanced Raman Spectroscopy)
TM	–	Transverse Magnetic mode

## Seznam použitých symbolů

$\alpha$	–	polarizovatelnost
$\alpha_i$	–	polarizovatelnost $i$ -tého dipólu
$\alpha_{\rho\sigma}$	–	$\rho\sigma$ komponenta tenzoru přechodové polarizovatelnosti
$\alpha_R$	–	kombinace komponent Ramanova tenzoru
$\alpha_{R0}$	–	Ramanova polarizovatelnost izolované molekuly
$\chi$	–	dielektrická susceptibilita
$\delta$	–	velikost pixelu
$\varepsilon$	–	elektrická permitivita
$\varepsilon_0$	–	elektrická permitivita vakua
$\varepsilon_b$	–	příspěvek k dielektrické funkci z přechodu elektronů mezi pásy
$\gamma$	–	stupeň elektronového rozptylu
$\Gamma$	–	činitel útlumu
$\lambda$	–	vlnová délka
$\lambda_{max}$	–	vlnová délka rezonance povrchového plazmonu
$\nu$	–	frekvence
$\nu_e$	–	frekvence záření excitačního zdroje
$\tilde{\nu}_e$	–	vlnčet záření excitačního zdroje
$\tilde{\nu}_{fi}$	–	vlnčet vibračního stavu molekuly
$\nu_{vib}$	–	vibrační frekvence molekulové vazby
$\rho$	–	objemová hustota náboje
$\sigma_{ads}^R$	–	Ramanův účinný průřez adsorbované molekuly na nanočástici
$\sigma_{free}^R$	–	Ramanův účinný průřez volné molekuly
$\omega$	–	úhlová frekvence
$\omega_{as}$	–	úhlová frekvence anti-Stokesova posuvu
$\omega_p$	–	úhlová frekvence rezonance povrchového plazmou
$\omega_{pm}$	–	úhlová frekvence „pump“ laserového zdroje záření
$\omega_s$	–	úhlová frekvence „Stokes“ laserového zdroje záření
$\xi_n$	–	Ricatti-Bessel funkce
$\psi_n$	–	Ricatti-Bessel funkce
$a_n$	–	kombinace Ricatti-Bessel funkcí
$A$	–	faktor zesílení elektromagnetického pole
$\overline{A}_{ij}$	–	matice interakcí
$b_n$	–	kombinace Ricatti-Bessel funkcí

$\bar{B}$	–	vektor magnetického toku
$c$	–	rychlost světla
$C_{abs}$	–	absorpční účinný průřez
$C_{ext}$	–	účinný průřez zhášení
$C_{scat}$	–	účinný průřez rozptylu
$D$	–	počet dimenzí
$\bar{D}$	–	vektor elektrické indukce
$\bar{E}$	–	vektor elektrického pole
$\bar{E}_0$	–	vektor amplitudy elektrického pole excitačního zdroje záření
$\bar{E}_{dip,i}$	–	vektor elektrického pole vyzařovaného $i$ -tým dipólem
$\bar{E}_e$	–	vektor elektrického pole vnějšího excitačního zdroje záření
$\bar{E}_{inc}$	–	vektor elektrického pole incidenčního záření
$\bar{E}_{loc,i}$	–	vektor lokálního elektrického pole $i$ -tého dipólu
$E_R$	–	elektrické pole Ramanova jevu
$E_s$	–	elektrické pole rozptýlené na částici
$E_{SERS}$	–	elektrické pole povrchově zesíleného Ramanova jevu
$ i\rangle$	–	počáteční energetická hladina
$f$	–	frekvence
$ f\rangle$	–	konečná energetická hladina
$F(\omega)$	–	faktor zesílení elektromagnetického pole
$g$	–	průměrné zesílení elektrického pole na částici
$G$	–	poměr zesílení intenzit záření
$h$	–	Planckova konstanta
$\bar{H}$	–	vektor magnetického pole
$I_A$	–	intenzita záření anti-Stokes posuvu
$I_e$	–	intenzita excitačního záření
$I_{fi}$	–	intenzita záření z přechodu z hladiny $ f\rangle$ na hladinu $ i\rangle$
$I_S$	–	intenzita záření Stokesova posuvu
$I_{SERS}$	–	intenzita záření zesíleného Ramanova jevu
$\bar{J}$	–	vektor objemové hustoty proudu
$\bar{k}$	–	vektor vlny
$m$	–	poměr indexů lomu
$M$	–	počet molekul
$n$	–	index lomu
$n_m$	–	index lomu obklopujícího prostředí

$N$	–	počet dipólů
$\bar{P}$	–	dipólový moment
$\bar{P}_i$	–	dipólový moment $i$ -tého dipólu
$Q_{abs}$	–	absorpční účinnost
$Q_{ext}$	–	zhášecí účinnost
$Q_{sca}$	–	rozptylová účinnost
$r$	–	velikost vektoru pozice
$\vec{r}$	–	vektor pozice
$\vec{r}_i$	–	vektor pozice $i$ -tého dipólu
$R$	–	poloměr kulové částice
$t$	–	čas
$u$	–	rychlost vlny
$u_{max}$	–	maximální rychlost vlny
$x$	–	parametr velikosti nanočástice

## Seznam příloh

Příloha 1: FDTD2D zdrojový kód

Příloha 2: Modelování dielektrických mikročástic

Příloha 3: CD s elektronickou verzí diplomové práce

## PŘÍLOHA 1: FDTD2D zdrojový kód

```
% --- Executes on button press in pmodeluj.
function pmodeluj_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject      handle to pmodeluj (see GCBO)
% eventdata    reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles      structure with handles and user data (see GUIDATA)

lam = str2double(get(handles.elamda,'String'));      %vlnova delka zdroje
zareni
d = str2double(get(handles.epixel,'String'));        %velikost pixelu v
nanometrech
D = str2double(get(handles.eprumer,'String'));      %prumer nanocastice v
nanometrech
epsR = str2double(get(handles.eperm,'String'));      %relativni
permitivita castice
sigR = str2double(get(handles.esig,'String'));      %elektricka vodivost
castice
ri = str2double(get(handles.elom,'String'));        %index lomu cstice
iter = str2double(get(handles.eiter,'String'));     %pocet iteracnich
kroku

%-----definovani konstant-----
c0=2.99792458e8;      %rychlost svetla ve vakuu
f = c0/lam;           %frekvence zdroje zareni
mu0=4.0*pi*1.0e-7;    %permeabilita vakua 1.256637061e-6
eps0=1.0/(mu0*c0^2);  %permitivita vakua 8.854187818e-12
Nx = 1500;            %pocet pixelu v ose x
Ny = 1500;            %pocet pixelu v ose y
dt = d/(sqrt(2)*c0);  %casovy krok
T = d/c0;             %cas za který vlna urazi vzdalenost d
E0 = 10;              %maximalni intenzita zareni
R = (D/2)/d;          %polomer castice v poctu pixelu
muR = (ri^2)/epsR;    %relativni permeabilita castice

%-----inicializace promennych-----
Ez = zeros(Ny,Nx);    %el. pole v ose z
Hx = zeros(Ny,Nx);    %mag. pole v ose x
Hy = zeros(Ny,Nx);    %mag. pole v ose y
SHx = zeros(Ny,1);    %minule hodnoty pro okrajovou podminku
SHy = zeros(1,Ny);    %minule hodnoty pro okrajovou podminku
A = zeros(Ny,Nx);     %koeficient pro vypocet Ez
B = zeros(Ny,Nx);     %koeficient pro vypocet Ez
C = zeros(Ny,Nx);     %koeficient pro vypocet Hx a Hy
source = zeros(Ny,1); %zdroj zareni
maxE = zeros(Ny,Nx);  %maximalni hodnoty el. pole
```



```

%-----prostorova distribuce parametru-----
for y=1:Ny
    for x=1:Nx
        if ((y-Ny/2)^2)+((x-700)^2)<=(R^2)
            eps = eps0*epsR;
            sig = sigR;
            mu = mu0*muR;
            A(y,x) = (2*eps-dt*sig)/(2*eps+dt*sig);
            B(y,x) = (2*dt)/(2*d*eps-d*dt*sig);
            C(y,x) = dt/(mu*d);
        else
            eps = eps0;
            mu = mu0;
            sig = 0;
            A(y,x) = (2*eps-dt*sig)/(2*eps+dt*sig);
            B(y,x) = (2*dt)/(2*d*eps-d*dt*sig);
            C(y,x) = dt/(mu*d);
        end
    end
end;

%-----vypocet elektromagnetickeho pole-----
pk = 0;
for pk=1:iter

    source(:,1) = E0*sin(2*pi*f*pk*T);          %vypocet zdroje zarení

    %-----vypocet Ez-----
    for x = 2:Nx
        for y = 2:Ny
            Ez(y,x) = A(y,x)*Ez(y,x)+B(y,x)*(Hy(y,x)-Hy(y-1,x)-Hx(y,x)+Hx(y,x-1));
        end
    end
    Ez(1,:) = Ez(2,:);

    %-----pridani zdroje-----
    Ez(:,1) = source(:,1);

    %-----vypocet Hx-----
    SHx(:,1) = Hx(:,Nx-1);          %ulozeni minulych hodnot pro okrajovou
    podminku
    for x = 1:Nx-1
        for y = 1:Ny
            Hx(y,x) = Hx(y,x)-C(y,x)*(Ez(y,x+1)-Ez(y,x));
        end
    end
end

```

```

Hx(:,Nx) = SHx(:,1);          %okrajova podminka

%-----vypocet Hy-----
for x = 1:Nx
    for y = 1:Ny-1
        Hy(y,x) = Hy(y,x)+C(y,x)*(Ez(y+1,x)-Ez(y,x));
    end
end

%-----vektory pro vykresleni linii castice-----
a1 = 700;
b1 = Ny/2;
r1 = 3*R/4;
X1 = [a1 a1+r1 a1+R a1+r1 a1 a1-r1 a1-R a1-r1; a1+r1 a1+R a1+r1 a1
a1-r1 a1-R a1-r1 a1];
Y1 = [b1-R b1-r1 b1 b1+r1 b1+R b1+r1 b1 b1-r1; b1-r1 b1 b1+r1 b1+R
b1+r1 b1 b1-r1 b1-R];

%-----vykresleni el. pole-----
figure(1);
imagesc(Ez);
line(X1,Y1,'Color','b');
xlabel(pk);
colorbar;
colormap(jet);

%-----maximalni hodnoty el. pole-----
for x=1:Nx
    for y = 1:Ny
        if maxE(y,x)<abs(Ez(y,x))
            maxE(y,x) = abs(Ez(y,x));
        end
    end
end

end      %konec iterace

%-----vykresleni maximalnich hodnot el. pole-----
figure(2);
imagesc(maxE);
line(X1,Y1,'Color','b');
colorbar;
colormap(jet);
%----konec programu-----

```

## PŘÍLOHA 2: Modelování dielektrických mikročastic

